

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**CARACTERIZACIÓN DE LAS CONSECUENCIAS  
INMUNOLÓGICAS DE LA HIPOCUPROSIS EN TERNEROS  
DE CRÍA**



**FCV-UNLP**

**TESIS DOCTORAL - M.V. JUAN ALBERTO TESTA**  
**AÑO 2015**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de

**DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**Caracterización de las consecuencias inmunológicas de la  
hipocuprosis en terneros de cría**

TESTA, Juan Alberto

**DIRECTOR:** Dr. MATTIOLI, Guillermo Alberto

**CODIRECTOR:** Dr. MINATEL, Leonardo

**CODIRECTOR:** Dr. VIGO, Germán

**LUGAR DE TRABAJO:**

- Laboratorio de Nutrición Mineral y Fisiología Reproductiva. Fac. Cs. Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

**MIEMBROS DEL JURADO**

APELLIDO Y NOMBRES: BACIGALUPE, Diana

APELLIDO Y NOMBRES: ESTEIN, Silvia

APELLIDO Y NOMBRES: RELLING, Alejandro

**AÑO 2015**

**Agradecimientos**

A mi director, „Coco“ Mattioli, que me ayudo plenamente en el desarrollo del plan doctoral y me aconsejo cada vez que lo necesite, convirtiéndose en un ejemplo al que seguiré, y con quien me gustaría continuar trabajando.

A German Vigo, quien extrañare y tendré en mi memoria para siempre. Fue fundamental para la realización de los experimentos, trabajando codo a codo hasta últimas horas del día, sin manifestar desconformidad. Con quien compartí momentos inolvidables, y estaré siempre en deuda, ¡que algún día espero saldar!

A mi codirector, Leonardo Minatel por contribuir en mi formación profesional. Por su colaboración en el desarrollo de este trabajo.

A Cecilia Furnus por predisposición siempre que la consulte, pero sobre todo por valorarme y haberme hecho parte de su grupo de trabajo.

A Alejandro E. Relling por su colaboración en el diseño de los experimentos y la evaluación estadística de los datos, y por las críticas constructivas cada vez que lo consulte.

A Mauricio Giuliodori por ayudarme con los analisis estadísticos de los datos.

A Cecilia Galosi quien fue la directora del “proyecto de radicación de investigadores y formación de doctores en áreas estratégicas” a través del cual se me otorgo la beca para la realización de este trabajo.

A mis amigos compañeros de ruta: Mateo Anchordoquy, Patricio Anchordoquy, Matias Sirini, Ramiro Desantadina, Elias Peruzzo, Ayelen Echiarle por su colaboración en los trabajos de campo.

A Diana E. Rosa y Belen Ventura por haberme soportado en el laboratorio y haberme ayudado en las tareas.

A Luis E. Fazzio por predisposición siempre que lo consulte, pero sobre todo por valorarme y haberme integrado a su grupo de trabajo.

A Analía Seoane por su predisposición y ayuda en el desarrollo de técnicas de laboratorio.

Al Instituto de Genética Veterinaria “Ing. Fernando Noel Dulout” (IGEVET) por brindar su espacio y recursos.

A la Chacra Experimental “Manantiales”, Chascomus, Ministerio de asuntos agrarios de la Provincia de buenos aires, particularmente a Gustavo Melani quien permitio la realización de los experimentos poniendo a disposición las instalaciones, los animales y el personal, que con la mejor predisposición me ayudaron durante los muestreos.

Al Laboratorio de Inmunoparasitología, de la Facultas de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Especialmente a la directora María Cecilia Venturini quien me permitió utilizar las instalaciones cada vez que lo necesite.

Al Servicio de Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas, de la Facultas de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, y en particular a la responsable del servicio, Gabriela Giacoboni, quien me permitio la utilización de las instalaciones

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Plata por brindarme una formación académica de excelencia y por ceder el espacio físico donde se desarrolló este trabajo.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica conjuntamente con la Universidad Nacional de La Plata, que me otorgaron la beca que permitió la realización de este trabajo de tesis.

A mi esposa Alejandrina por haberme apoyado en todo momento con mucho amor y compromiso, y por haberme regalado a Valentín y próximamente Joaquín, quienes no han colaborado demasiado con mi tesis, pero estoy muy agradecido de que sean mis hijos.

A mis hermanos por hacerme sentir especial y estar siempre cuando los necesité, sin egoísmo y con mucha humildad, y por haberme regalado tantos sobrinos a los cuales también agradezco, pero no los nombro porque son muchos.

A mis abuelos por ser un ejemplo a seguir y habernos educado en la unión de la familia, pese a las diferencias nos enseñaron a ser tolerantes y estar cuando alguien lo necesita.

Y por último quiero agradecer especialmente a los responsables de mi formación académica, y los forjadores de la persona que soy, Papi y Mami. Valentin Omar Testa y Mirta Liliana Tessio, de quienes estoy muy orgulloso.

### **Publicaciones parciales del presente trabajo de tesis**

Efecto de la hipocuprosis sobre la funcionalidad y el número de neutrófilos en terneros de cría

Testa JA., Vigo G., Diaz AP., Flamini A., Lasta G., Minatel L.

XIV Congreso de Ciencias Morfológicas y 11<sup>avas</sup> Jornadas de Educación, pag. 71 (2012).

Parámetros hematológicos y ganancia de peso en terneros de cría expuestos a hipocupremia subclínica, con y sin suplementación con Cu

Testa, J.A., Vigo, G., Lasta, G., Rosa, D.E., Melani, G., Minatel, L., Mattioli, G.A.

Revista Argentina de Producción animal Vol 32 Supl. 1:121-205 (2012).

<b>CARACTERIZACIÓN DE LAS CONSECUENCIAS INMUNOLÓGICAS DE LA HIPOCUPROSIS EN TERNEROS DE CRÍA.....</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>2</b>
<b>I - INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
I-A) ABSORCIÓN Y METABOLISMO DEL CU EN LOS BOVINOS.....	3
I-a.1) <i>Absorción.....</i>	3
I-a.2) <i>Metabolismo hepático del Cu.....</i>	5
I-a.3) <i>Circulación post-hepática .....</i>	6
I-a.4) <i>Vías de eliminación del Cu .....</i>	7
I-a.5) <i>Rol fisiológico del Cu en el organismo .....</i>	7
I-B) DEFICIENCIA DE COBRE O HIPOCUPROSIS.....	8
I-b.1) <i>Patogenia de la carencia de Cu .....</i>	8
I-b.2) <i>Consecuencias de la deficiencia de Cu.....</i>	8
I-b.3) <i>Diagnóstico de la carencia de Cu.....</i>	10
I-C) CONSECUENCIAS HEMATOLÓGICAS E INMUNOLÓGICAS DE LA HIPOCUPROSIS.....	12
I-D) FUNDAMENTOS DE LA SUPLEMENTACIÓN ESTRATÉGICA CON COBRE PARA EVITAR PÉRDIDAS PRODUCTIVAS EN TERNEROS. ....	20
<b>II - OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....</b>	<b>22</b>
II-A) OBJETIVO PRINCIPAL.....	22
II-B) OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
II-C) HIPÓTESIS MÁS RELEVANTE.....	22
<b>III MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>23</b>
III-A) DISEÑO EXPERIMENTAL .....	23
III-B) MÉTODOS ANALÍTICOS .....	26
III-b.1) <i>Cupremias.....</i>	26
III-b.2) <i>Hemogramas .....</i>	26
III-b.3) <i>Funcionalidad de los neutrófilos.....</i>	26
III-b.4) <i>Índice mitótico de linfocitos.....</i>	27
III-b.5) <i>Índice de daño de linfocitos.....</i>	28
III-b.6) <i>Respuesta vacunal a IBR.....</i>	29
III-C) ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	30
<b>IV - RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
IV-A) CUPREMIAS .....	31
IV-B) PARÁMETRO PRODUCTIVO .....	31
IV-C) PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS.....	32
IV-c.1) <i>Hemograma eritrocitario.....</i>	32
IV-c.2) <i>Hemograma leucocitario .....</i>	34
IV-D) PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS .....	35
IV-d.1) <i>Funcionalidad de los neutrófilos .....</i>	35
IV-d.2) <i>Funcionalidad de los linfocitos .....</i>	35
<b>V – DISCUSIÓN .....</b>	<b>38</b>
<b>VI – CONCLUSIONES .....</b>	<b>47</b>
<b>VII – BIBLIOGRAFÍA CITADA.....</b>	<b>48</b>
<b>VIII-TABLAS Y FIGURAS.....</b>	<b>61</b>
<b>IX-ABREVIATURAS.....</b>	<b>79</b>

## **CARACTERIZACIÓN DE LAS CONSECUENCIAS INMUNOLÓGICAS DE LA HIPOCUPROSIS EN TERNEROS DE CRÍA**

**Palabras clave:** hipocuprosis, bovinos, hematología, inmunología, terneros, cría.

### **RESUMEN**

La deficiencia de cobre (Cu) es la segunda carencia mineral en sistemas pastoriles en el mundo, y posee una incidencia endémica en diferentes zonas de la Argentina. Un área afectada es la Cuenca del Río Salado, provincia de Buenos Aires, destinada esencialmente al sistema de cría bovina. Una de las consecuencias productivas más graves de la hipocuprosis en la zona es la menor ganancia de peso en los terneros, lo que ha sido asociado a niveles de hipocupremia severa. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos asociados a este bajo rendimiento. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo de tesis fue evaluar parámetros hematológicos e inmunológicos durante el período de cría en terneros de 4 a 7 meses de edad, en la Cuenca del Río Salado. Para ello, se estudiaron parámetros hematológicos e inmunológicos durante un período seco (Experimento 1) y durante un período de lluvias, (Experimento 2) en años consecutivos. Los resultados obtenidos demostraron que: a) el hematocrito fue un buen indicador de la deficiencia severa de Cu y del riesgo de pérdida de peso; b) el conteo de leucocitos circulantes no mostró valores fuera de los rangos normales; c) los neutrófilos no se vieron alterados en su capacidad fagocítica y lítica; d) el índice mitótico en linfocitos no estuvo asociado a los bajos niveles de Cu; e) la tasa de daño en el ADN de los leucocitos circulantes fue un indicador sensible incluso en los casos de deficiencia moderada de Cu; y f) la deficiencia severa de Cu redujo los títulos vacunales durante la primovacunación con IBR, mientras que este efecto revirtió durante la revacunación al mejorar el estatus de Cu.



## **Hematologic and immunologic consequences of copper deficiency in breeding calves**

**Keywords:** hypocuprosis, cattle, hematology, immunology, calves, breeding.

### **ABSTRACT**

In the world, copper (Cu) deficiency is the second most important mineral deficiency in grazing systems and it has an endemic incidence in different areas of Argentina. The Cuenca del Río Salado in Buenos Aires Province is an important area used to cattle breeding system, that it is affected by hypocuprosis. The most serious consequence of hypocuprosis is the lessen weight gain in calves. It is known that weight loss in calves is associated with severe hypocupremia but, the mechanisms involved in this process are still unknown. Therefore, the aim of this Thesis was to evaluate hematological and immunological parameters during the breeding period in calves between 4 and 7 months of age, in the Cuenca del Río Salado. For this purpose, hematological and immunological parameters were studied during a rainless period (Experiment 1), and within a rainfall period (Experiment 2) for two consecutive years. The results obtained here demonstrated that: a) hematocrit was a sensitive indicator of Cu severe deficiency and weight lost risk; b) leukocyte blood count did not show abnormalities; c) neutrophils were not altered in their phagocytic or lytic capabilities; d) lymphocytes mitotic index was not associated with levels of Cu deprivation; e) the rate of DNA damage in circulating leukocytes proved to be a sensitive indicator of even Cu moderate deficiency; and f) Cu severe deficiency reduced specific antibody titers after immunization with IBR vaccine but this effect changed by improving Cu status during revaccination.

## I - INTRODUCCIÓN

### I-A) Absorción y Metabolismo del Cu en los bovinos.

#### **I-a.1) Absorción**

El conocimiento del metabolismo del cobre avanzó mucho en los últimos años gracias a los trabajos de investigación impulsados por el estudio de enfermedades en humanos tales como las de Wilson y Menkes (Laloti y col., 2009), pero pocos trabajos existen sobre el metabolismo del Cu en bovinos.

La absorción del cobre dietario ocurre especialmente en el intestino delgado (Hill and Link, 2009). En el ribete en cepillo de los enterocitos se ha identificado un transportador de Cu llamado Copper transporter 1 (CTR1) (Lönnerdal., 2008) cuya expresión aumenta en estados de carencia (Nose y col., 2010). El CTR1 es una proteína integral, con tres dominios transmembrana, que incorpora el Cu en estado cuproso ( $\text{Cu}^{+1}$ ) (Van den Berghe y Klomp., 2010). Debido a que la mayor parte del cobre llega al intestino en su forma cúprica ( $\text{Cu}^{+2}$ ), éste debe ser reducido. Este rol lo cumplen el ácido ascórbico asociado a dos metaloreductasas: Duodenal cytochrome b (Dcytb), y la six transmembrane epithelial antigen of the prostate 2 (Steap 2), que actúan además como reductasas del hierro, pasando el  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$  (Lönnerdal., 2008). Ambos elementos en estado reducido pueden ingresar también por un transportador de cationes bivalentes 1 (DMT1) (Arredondo and Nuñez., 2005). El uso de un mismo transportador explica el efecto de interferencia de altas concentraciones de Fe sobre la absorción del Cu, siendo el Fe uno de los responsables de la deficiencia de Cu en bovinos (Underwood y Suttle., 1999). Sin embargo, recientemente se ha sugerido que el Cu podría ingresar al enterocito por pinocitosis, especialmente durante la maduración del aparato digestivo (Lutsenko y col., 2007-a).

Se considera que la absorción intestinal de Cu es variable entre especies pero en todas ellas estaría regulada por el estatus de Cu del animal, y por la concentración de Cu en el alimento. En humanos tratados con  $^{65}\text{Cu}$ , el porcentaje de Cu dietario absorbido fue del 12

% cuando la dieta era rica en Cu (7,5 mg/día), pero aumentaba al 36 % cuando la dieta poseía niveles óptimos de Cu (1,68 mg/día) y finalmente ascendía al 56 % cuando la dieta era deficiente (0,78 mg/día) (Turnlund y col., 2005).

En rumiantes no se han realizado estudios profundos sobre los mecanismos de absorción, pero se sabe que el porcentaje de absorción es menor que en no rumiantes, promediando el 5,4% (Underwood and Suttle., 1999). El factor responsable de esta disminución es indudablemente la digestión ruminal, ya que el porcentaje de absorción es del 75 al 80% en los lactantes y desciende a menos del 10% con el desarrollo de la actividad ruminal (Spears, 2003). Además, este valor varía en función de la fuente de cobre (Balemi et al., 2010; Pal y col., 2010), la raza (Mullis y col., 2003; Miranda y col., 2010) y la presencia de elementos nutricionales de interferencia tales como el molibdeno (Hansen y col., 2008), el azufre (Spears., 2003), y el hierro (Ward y col., 1997).

Una vez absorbido, el Cu se une a proteínas citoplasmáticas, especialmente a la metalotioneína (MT) que lo almacena (Tapiero y Tew., 2003), o bien a proteínas denominadas chaperonas que bloquean el potencial oxidativo del Cu y lo conducen hacia diferentes vías metabólicas (Figura 1). Una chaperona, denominada cytochrome c oxidase copper chaperone (Cox17), transporta y cede el Cu para que sea añadido a la citocromo C oxidasa mitocondrial. Otra de ellas, llamada copper chaperone for superoxide dismutase (CCS) entrega el Cu para ser incorporado a la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD1). Finalmente la antioxidant 1 copper chaperone (Atox1) se encarga de transportar el Cu dentro de la célula, facilitando su incorporación a un sistema de vesículas aisladas y al trans Golgi network (TGN). A diferencia del ingreso por CTR1, estos mecanismos de transporte intracelulares a sistemas membranosos son dependientes de la energía liberada por ATPasas, de las cuales las ATP7A y ATP7B son las más importantes (Turski y Thiele., 2008).

La ATP7A introduce el Cu al TGN, el cual se encarga de sacarlo de la célula. Esta ATPasa es especialmente importante en el enterocito, para que el Cu sea liberado al

sistema porta (Prohaska., 2008). Cuando la ATP7A no funciona el Cu queda retenido en el enterocito, hasta que éste se descama y se pierde. Se genera de este modo una grave deficiencia de Cu conocida como “Enfermedad de Menkes” en humanos (Hill y Link., 2009). La ATP7B es similar a la anterior, pero se encuentra especialmente en hígado, cerebro y placenta donde se encarga de facilitar la salida del Cu de la célula (Barry y col., 2010).

El Cu abandona la membrana basolateral del enterocito por mecanismos aún no bien definidos pero posiblemente se realice empleando las vesículas del TGN o bien los mismos transportadores hallados en el borde luminal de la célula (Harris., 2000; Lönnnerdal., 2008). El Cu pasa a la circulación portal y llega al hígado unido principalmente a la  $\alpha_2$  macroglobulina y a la albúmina, (Collins y col., 2010) y secundariamente a la transferrina, o a proteínas específicas como la transcupreína (Løvstad., 2004; Liu y col., 2007).

#### **I-a.2) Metabolismo hepático del Cu**

El hígado capta el Cu que llega por la circulación portal y lo distribuye entre las chaperonas ya mencionadas. Adicionalmente el hepatocito lo envía a la circulación sistémica, incorporándolo a la ceruloplasmina (Cp). El Cu excedente puede derivarse a la bilis para su eliminación, o se deposita, convirtiéndose entonces el hígado en el único sitio de reserva orgánica de este metal (Underwood y Suttle., 1999; Roberts y Sarkar., 2008). Estos movimientos de Cu en el hepatocito se realizan en forma activa por la ATP7B. Esta ATPasa incorpora el Cu a la Cp, una ferrooxidasa que sale a la circulación y representa la principal fracción plasmática de Cu (Healy y Tipton., 2007). Por otro lado la ATP7B también se activa cuando hay un exceso de Cu en el hepatocito y genera la incorporación del mismo al sistema de vesículas que lo eliminan por la vía biliar (Lutsenko y col., 2007 b). Una falla en su funcionamiento causa graves acumulaciones tóxicas de Cu, especialmente en hígado y cerebro. Esta situación se presenta en humanos con la denominada “Enfermedad de Wilson” (Weiss y col., 2008). Finalmente la ATP7B genera el depósito hepático de Cu por unión del metal a la Metalotioneína (MT) (Laloti y col., 2009).

Un bovino con adecuado estatus de Cu posee una reserva hepática superior a las 100 ppm, pero su concentración seguirá aumentando mientras se encuentre en balance positivo (Balemi y col., 2010). Esto establece un rango de normalidad entre 100 y 300 ppm (McDowell., 1992) por encima del cual se corre el riesgo de acumulaciones que pueden derivar en intoxicación crónica con Cu, especialmente cuando se alcanzan las 1000 ppm (Minervino y col., 2008). El organismo evita esta posibilidad aumentando las pérdidas por bilis (Jenkins y Hidioglou., 1989) y bajando la expresión de genes encargados de sintetizar proteínas involucradas con el transporte el Cu (CTR1, ATP7A, ATP7B, y Cox17) (Han y col., 2009).

### **I-a.3) Circulación post-hepática**

La concentración plasmática normal de Cu o cupremia es a partir de los 60 µg/dl (Laven y Livesey., 2006). La mayor fracción, aproximadamente un 80 %, está unida a Cp (Underwood y Suttle., 1999), el resto del Cu viaja unido a albúmina y a una globulina llamada transcupreína, mientras que cantidades menores lo hacen en otras moléculas más pequeñas (Harris., 2000; Collins y col., 2010), pero no está claro cuál es la forma biodisponible Cu que es liberado desde las reservas hepáticas. En este sentido, hasta hace poco tiempo se pensó que la Cp era la forma de distribución del Cu hepático hacia los tejidos (Underwood y Suttle., 1999). Actualmente se sabe que una aceruloplasminemia no altera el metabolismo del Cu, pero si el del Fe, que no puede ser movilizado generando anemias ferroprivas (Meyer y col., 2001; Cater y Mecer., 2005). Esto se debe a que la Cp posee acción ferroxidasa, que permite la salida del  $\text{Fe}^{+2}$  del hígado y su incorporación a la transferrina como  $\text{Fe}^{+3}$  (Harris., 2000). Por otro lado la acción oxidasa de la Cp evita la acumulación de  $\text{Fe}^{+2}$  y de  $\text{Cu}^{+1}$ , los cuales pueden catalizar la reacción de Fenton generando daño oxidativo, por lo cual se le otorga a la Cp un importante rol antioxidante (Arredondo y Nuñez., 2005; Healy y Tipton., 2007). También se postuló a la albúmina como la transportadora de Cu, la cual posee incluso un sitio específico de unión para el mismo

(Løvstad., 2004), pero estudios en ratas indican que su función no sería esencial en el transporte plasmático de Cu (Cater y Mecer., 2005). Otras moléculas, como factores de coagulación y proteínas de bajo peso molecular, tendrían importancia en esta distribución (Cater y Mecer., 2005).

#### **I-a.4) Vías de eliminación del Cu**

La principal vía de eliminación es la bilis (Cousin., 1985). Concentraciones menores pueden perderse por orina (Buckley., 1991), así como por leche, lo cual hace que la lactancia no represente un período de altos requerimientos (NRC., 2001).

#### **I-a.5) Rol fisiológico del Cu en el organismo**

El Cu posee cierta importancia como componente estructural, pero fundamentalmente es usado por el organismo como cofactor enzimático de las metaloenzimas (Turski y Thiele., 2008). Una lista de las mismas con su función se presenta en la Tabla 1. De las enzimas nombradas es interesante enfatizar en las que están relacionadas con las defensas antioxidantes (SOD y Ferroxidasas: Cp y Hefaestina) y en la que su falla pueda aumentar la generación de Especies Reactivas del Oxígeno (ERO) (Citocromo C Oxidasa). (ver, Consecuencias hematológicas e inmunológicas de la hipocuprosis, pag 16).

## **I-B) Deficiencia de cobre o hipocuprosis.**

### **I-b.1) Patogenia de la carencia de Cu**

La hipocuprosis puede generarse por bajo aporte de Cu en la dieta, provocando una carencia simple de Cu, o bien por la presencia de otros minerales que se encuentren en elevadas concentraciones en la dieta, bloqueando la absorción del Cu, como son el Fe, SO<sub>4</sub> y Mo generando una carencia condicionada o secundaria de Cu

La patogenia de la deficiencia de Cu implica una secuencia de etapas sucesivas que comienzan con la pérdida de la reserva hepática (depleción), la disminución de la cupremia (deficiencia), y la menor actividad de cuproenzimas (disfunción), que lleva finalmente a la manifestación de consecuencias (enfermedad), primero subclínicas y luego evidentes o clínicas (Figura 2).

### **I-b.2) Consecuencias de la deficiencia de Cu**

Las consecuencias clínicas se inician con alteraciones del color del manto (acromotriquia) y anteojeras, y avanzan con diarreas, deformaciones osteoarticulares, fracturas espontáneas, caquexia y muerte (Figura 3 y 4). Desde el punto de vista productivo son más graves las consecuencias inaparentes y persistentes las cuales se sostienen ante la falta de diagnóstico y prevención. Estas incluyen la menor ganancia de peso, la menor resistencia a infecciones y la menor eficiencia reproductiva (Underwood y Suttle., 1999).

Las menores ganancias de peso ya han sido caracterizadas en varias zonas de Argentina, como en el este de Chaco y Formosa (Balbuena y col., 1989-a y -b), Entre Ríos (Ricciardino y col., 1991-a y -b), Santa Fe (Correa Luna y Lagos., 1985), Cuenca del Salado (Fazzio., 2006), etc. En sistemas de cría, los terneros dejan de ganar entre 3 y 10 kilos mensuales de peso cuando sufren hipocupremias severas (Fazzio y col., 2010).

Las consecuencias inmunológicas poseen muchas más evidencias *in vitro* que resultados *in vivo* que demuestren alteraciones inmunológicas bajo nuestros sistemas productivos de cría de terneros (Minatel y Carfagnini., 2000; Bohman et al., 2002). De

cualquier modo se ha asociado la presencia de hipocuprosis con una menor respuesta inmune innata (Cerone y col., 1998; White y col., 2009), menor producción de citocinas (Torre et al., 1995; Gengelbach y col., 1997) y fallas en la respuesta adaptativa humoral (Cerone et al., 1995) y celular (Ward y col., 1997).

Los primeros estudios que relacionaron las alteraciones reproductivas con la deficiencia de Cu se basaron en experimentos de tipo “dosis-respuesta”, en los cuales la suplementación con Cu mejoró los parámetros reproductivos (Soltan y Jenkins., 1983; Kappel y col., 1984; Maas., 1987; Ingraham y col., 1987; Hilario y col., 1991). Phillip y col., (1987), llegaron a la conclusión de que las alteraciones reproductivas derivadas de la deficiencia de Cu dependían de un exceso de Mo en la dieta. Éste sería el responsable de la menor fertilidad, causando demoras en la aparición de la pubertad, menores tasas de concepción y alteraciones del ciclo estral. En el mencionado experimento se observó además que la suplementación con Mo producía aparentemente una liberación menor de la hormona luteinizante. Más tarde, ratas deficientes en Cu, alimentadas con dietas ricas en Mo presentaban reducciones en los picos de la FSH y en la secreción de estrógenos (Igarza y col., 1996), resultados similares a los publicados por Phillip y col., (1987), pero el experimento lo realizó con bovinos. En cultivos *in vitro* de células tecales, la adición de tiomolibdatos al medio inhibió la diferenciación celular mediada por LH, disminuyendo la producción de androstenediona, situación que se revirtió suplementando el medio con Cu (Kendall y col., 2006). Estos estudios conforman la base de la asociación original entre la hipocuprosis y las fallas reproductivas (McDowell., 1992; Underwood y Suttle., 1999). Estudios realizados en rodeos lecheros de Inglaterra que exhiben una subfertilidad generalizada, con disminución o ausencia de celos, que revierte con la suplementación con Cu (Kendall y col., 2003). Estos autores sugieren que estos cuadros son debidos a fallas en el desarrollo de las células de la granulosa estimuladas por FSH y disminución en los niveles de estrógeno producidos (Kendall y col., 2003). Existen evidencias que relacionan un inadecuado aporte de Cu con numerosas alteraciones en la reproducción, siendo un factor



común en estos casos la existencia de estrés oxidativo, alteraciones estructurales y fallas energéticas (Keen y col., 1998).

### **I-b.3) Diagnóstico de la carencia de Cu**

La evaluación de la patogenia de la hipocuprosis (Figura 2) establece las alternativas de diagnóstico para determinar el estatus de Cu del animal, pudiendo diagnosticar la carencia a través de la concentración hepática de Cu, concentración plasmática de Cu y actividad de enzimas Cu dependientes.

La concentración hepática de Cu es el primer parámetro afectado (etapa de depleción), determinando además el nivel de reserva orgánica del animal. Su concentración guarda una relación lineal con la absorción intestinal cuando la dieta cubre los requerimientos, por lo cual es un excelente indicador de depósito (Underwood y Suttle., 1999). Lamentablemente, la obtención de la muestra se realiza por biopsia hepática, limitando su uso como técnica de diagnóstico del estatus de Cu de los rodeos, y quedando solo como una técnica de uso experimental.

El análisis de cupremia es un indicador sensible de la etapa de deficiencia, para ello resulta útil subdividir los valores de cupremia en tres rangos: por encima de 60  $\mu\text{g/dl}$  (normocupremia), entre 60 y 30  $\mu\text{g/dl}$  (hipocupremia leve) y aquellos menores de 30  $\mu\text{g/dl}$  (hipocupremia severa) (Tabla 2). La normocupremia sugiere que los animales no tienen un desbalance. La hipocupremia leve, en cambio, es indicativa de que la reserva hepática de Cu no es capaz de mantener el nivel plasmático normal, pero posiblemente no se vean afectadas las enzimas Cu dependientes a nivel tisular, debido a que los animales no suelen mostrar signos clínicos importantes de la enfermedad ni responden a la suplementación con Cu en los experimentos dosis-respuesta (Fazzio y col., 2010). La hipocupremia severa es indicativa de un desbalance de Cu más importante con la posibilidad de que si se mantiene por tiempo prolongado se produzca un compromiso enzimático, debido a que con valores inferiores a 30  $\mu\text{g/dl}$  se presentan las principales consecuencias de la enfermedad (Suttle.,

1983). Cuando existe molibdenosis las cupremias pueden ser engañosamente elevadas, por formación complejos de Cu y Mo no disponibles, pero estos pueden descartarse tratando el plasma con ácido tricloroacético antes de su lectura por espectrofotometría de absorción atómica (Underwood y Suttle., 1999). Las muestras remitidas al laboratorio no deben presentar hemolisis, debido a que los eritrocitos presentan altas concentraciones de Cu (Kodama y col., 2012), que altera la concentración de Cu plasmático. Otra alternativa es la medición de la actividad de Cp sérica, que representa del 70 al 90 % del Cu plasmático (Kincaid, 1999). Debido a que el muestreo de sangre es rápido y sencillo, éste es de elección en el diagnóstico de rutina y en los estudios poblacionales (Ramírez y col., 1997).

La menor actividad de las enzimas Cu dependientes es un indicador directo de la etapa de disfunción que llevarán a las manifestaciones de la hipocuprosis (Underwood y Suttle., 1999). Sin embargo, existen varios inconvenientes para utilizarlas con fines diagnósticos. Por un lado, la etiología de los signos clínicos es muchas veces compleja y no permite asociar una consecuencia de la deficiencia con una falla enzimática específica. Como ejemplo, resulta evidente que la acromotriquia se debe a una disfunción de la tirosinasa (Bohman., 2002), pero una menor ganancia de peso resulta difícil de asociar a una enzima o actividad Cu-dependiente. Por otra parte hay enzimas sobreexpresadas para su función, y su menor actividad no implica un daño bioquímico (Mills., 1983). Finalmente, la medición de la actividad de ciertas enzimas requiere de muestreos altamente invasivos y de técnicas poco sencillas, lo cual impide su utilización con fines diagnósticos de rutina (Suttle., 1986; Underwood y Suttle., 1999).

### **I-C) Consecuencias hematológicas e inmunológicas de la hipocuprosis.**

Existen algunos antecedentes de cambios hematológicos generados por la hipocuprosis, pero lamentablemente no han sido asociados a otras consecuencias, como fallas inmunes, reproductivas o de crecimiento.

Si bien la anemia se cita como consecuencia de hipocuprosis severas y prolongadas en todas las especies (Underwood., 1981), existen grandes diferencias en este sentido. Por un lado quedó bien establecido que la anemia se presenta con facilidad en cerdos deficientes en Cu o Fe (Gubler y col., 1956), pero es muy poco frecuente en rumiantes con hipocuprosis. Así, Campbell y col., (1974) y Humphries y col., (1983) causaron severas hipocuprosis experimentales sin llegar a detectar cambios en la concentración de hemoglobina (Hb) ni en el hematocrito (Gengelbach y col., 1994) indujeron la hipocuprosis, con excesos de Fe y Mo, en vaquillonas y en sus crías, y solamente los terneros con dietas excesivas en Mo presentaron disminución del hematocrito a los 6 meses de tratamiento. Según (Suttle., 1987-b; Suttle., 2010) en corderos la anemia sería de tipo hipocrómica y microcítica, similar a la anemia ferropriva, pero en ovejas y vacas sería también hipocrómica pero macrocítica. La causa de la anemia durante la hipocuprosis, especialmente cuando coincide con la carencia de Fe, se ha relacionado con la menor actividad de dos enzimas con actividad ferroxidasa como la Cp y la Hefaestina, necesarias para la movilización del Fe desde el hígado y desde el intestino, respectivamente (Bonham y col., 2002). Esto concuerda con los resultados de Mills y col., (1976), quienes detectaron un aumento en la concentración de Fe en el hígado al disminuir la concentración de la Cp plasmática. En el mismo sentido, estos autores consideran que los cambios en la concentración de Hb no son suficientemente importantes como para otorgarles valor diagnóstico. Otra causa de la anemia, que no se asocia al metabolismo del Fe, podría ser un aumento en el daño oxidativo generado por fallas en las defensas antioxidantes dependientes de Cu (Sukalski y col., 1997; Attri y col., 2006). Cuando la membrana del eritrocito se altera por daño oxidativo

o bien manifiesta alteraciones incipientes de apoptosis, como la exposición de fosfatidilserina en la membrana externa, se estimula su degradación por los tejidos hemocateréticos (Föller y col., 2008). La carencia de Cu y su asociación con fallas en la hemopoyesis tomó importancia últimamente en medicina humana, cuando se encontraron síndromes mielopoyéticos (Haddad y col., 2008), con pancitopenia (Imataki y col., 2008) y anemias macrocíticas (Angotti y col., 2008) en pacientes con severas deficiencias de Cu. Si bien los autores sugieren las causas que ya se citaron, otros nuevos hallazgos resultan interesantes. En este sentido se ha demostrado que la carencia de Cu inhibe la diferenciación y la multiplicación de las células progenitoras hematopoyéticas CD34 (+) (Lazarchick., 2012).

Los antecedentes que dan cuenta de las consecuencias inmunológicas de la hipocuprosis en bovinos son numerosos. Sin embargo la mayoría de estos trabajos son estudios experimentales *in vivo* e *in vitro* que evalúan el efecto de la deficiencia de Cu sobre el sistema inmune, evaluando a este sistema a través de técnicas de laboratorio, que no necesariamente se pueden extrapolar a una mayor incidencia de enfermedades en animales, en este sentido hay poca evidencia que demuestre un aumento en la incidencia de enfermedades en animales a campo. Mientras que los primeros son numerosos y de resultados variables, los segundos son escasos y difíciles de extrapolar a las condiciones productivas locales (Spears., 2000).

La inmunidad innata es la primera línea de defensa del organismo, que reconoce patrones moleculares asociado a patógenos que es efectiva en contener la mayoría de las infecciones, pero sin generación de memoria inmunológica (Abbas y col., 2008). Su efectividad se basa en que se mantenga intacta la integridad de los epitelios y las mucosas, en las sustancias antimicrobianas inespecíficas presentes en secreciones o en el medio interno, y esencialmente en la adecuada actividad de células de la inmunidad innata. Estos incluyen neutrófilos y macrófagos con capacidad de fagocitar y lisar microorganismos, y a las células citotóxicas natural killer (NK), capaces de inducir apoptosis en células infectadas

o alteradas (Abbas y col., 2008). La actividad de dichas células es dependientes de las defensas antioxidantes del animal (Victor y col., 2004; Djordjević., 2004). Estas defensas dependen en parte del funcionamiento de metaloenzimas Cu dependientes las cuales fallan durante la hipocuprosis (Cerone y col., 2000-b). Tales metaloenzimas incluyen la Cobre-Zinc Superóxido Dismutasa (Cu-Zn SOD) y la Citocromo C Oxidasa (CCO) a nivel intracelular, y la ceruloplasmina (Cp) circulante (Cerone y col., 2000-b). La Cu-Zn SOD se encarga de la dismutación de los iones superóxido ( $O_2^\circ$ ), generando peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) que es finalmente inactivado por catalasas o glutatión peroxidases. Estos mecanismos de defensa contra especies reactivas de oxígeno (ERO) están activos en todas las células, pero aún más en células con demanda metabólica elevada, donde la generación de energía por la cadena transportadora de electrones genera mayor cantidad de  $O_2^\circ$  (Ringler., 1996). La disfunción de la Cu-Zn SOD provoca la acumulación de  $O_2^\circ$  que sirve de sustrato para la formación del poderoso ión hidroxilo ( $OH^\circ$ ), el cual finalmente genera el daño oxidativo de los tejidos (Nozik-Grayck y col., 2005). La formación del OH depende de la reacción de Fenton, en la cual se emplean  $O_2^\circ$  y  $H_2O_2$ , y que debe ser catalizada por un catión con capacidad de óxido-reducción, como es el hierro (Cheeseman y Slater., 1993; Imlay., 2008). Las células fagocíticas, además de generar ERO por el proceso de respiración celular, también los generan como parte de los mecanismos de lisis de los microorganismos fagocitados (Abbas y col., 2008; Imlay., 2008). Cuando en el fagocito se forma el fagolisosoma, en su membrana se activa una enzima llamada NADPH oxidasa, que genera y vuelca  $O_2^\circ$  hacia el interior del fagolisosoma (El-Benna y col., 2009). A partir del  $O_2^\circ$  la Cu-Zn SOD genera  $H_2O_2$ , que es utilizada por la enzima Mieloperoxidasa para combinarla con iones haluros y generar ácidos hipohalosos reactivos, que son tóxicos para las bacterias. Los macrófagos también producen intermediarios reactivos del nitrógeno, en especial óxido nítrico (ON) por la acción de la enzima sintetasa inducible del ON (NOSi). En el interior del fagolisosoma el ON puede combinarse con el  $H_2O_2$  o con el  $O_2^\circ$  y producir radicales peroxinitrito, muy reactivos y capaces de destruir los microorganismos (Abbas et al., 2008).

La Cp es una enzima Cu dependiente que además de tener capacidad antioxidante propia, es una proteína de fase aguda que colabora en el control del metabolismo del hierro (Cousin., 1985; Hellman y Gitlin., 2002). Posee acción ferroxidasa controlando la salida del Fe desde el hígado y su unión a la transferrina, asegurando su distribución hacia otros tejidos, y por otro lado evita que el hierro quede disponible para catalizar de manera descontrolada la reacción de Fenton (Oldham y Bowen., 1998; Hellman y Gitlin., 2002).

Finalmente la CCO es un complejo que contiene los citocromos a y a<sub>3</sub> de la cadena respiratoria, encargados de catalizar la formación del ATP y la transferencia de 4 electrones y 4 hidrogeniones al O<sub>2</sub> para formar 2 moléculas de agua. Cuando la CCO falla se perjudica la producción de energía, pero además aumenta la producción de O<sub>2</sub><sup>°</sup>, con el consiguiente desafío oxidativo (Mills., 1987; Medeiros y Jennings., 2002).

Los efectos de la deficiencia de Cu sobre la respuesta inmune innata se han estudiado evaluando la funcionalidad de los fagocitos, como neutrófilos y macrófagos, y el comportamiento de las proteínas de fase aguda.

Los neutrófilos se ven afectados en etapas tempranas de la deficiencia (Mills., 1987). Su concentración generalmente no desciende (Cerone y col., 1998) o incluso aumenta en experimentos donde la deficiencia se genera con elevadas concentraciones de molibdeno en la dieta (Arthington y col., 1996; Gengelbach y col., 1997). La funcionalidad celular, en cambio, está claramente afectada durante la hipocuprosis comprometiendo la capacidad fagocítica y lítica de los neutrófilos (Boyne y Arthur., 1986; Xin y col., 1991; Cerone y col., 1998). Sin embargo, existen trabajos que no encuentran alteradas estas funciones (Stabel y col., 1993; Arthington y col., 1995; Gengelbach y col., 1997). De cualquier modo parece haber acuerdo en que las funciones de los neutrófilos se ven afectadas por la pérdida de la capacidad de producir ERO (Stabel y col., 1993;) junto con un deterioro de sus defensas antioxidantes (Xin y col., 1991; Gengelbach y col., 1997; Cerone y col., 2000-a).

Los antecedentes indican que los macrófagos son afectados en menor medida que los neutrófilos, aunque siempre con resultados variables. Mientras Gengelbach y col., (1997)

no encontraron afectada la capacidad fagocítica y lítica de macrófagos alveolares en terneros, Saker y col., (1998) informaron una menor actividad fagocítica en casos complicados con festucosis. Serían estas funciones y no la cantidad de células las afectadas, incluso la concentración de monocitos puede aumentar en terneros Cu deficientes (Cerone y col., 1998). Las causas de las disfunciones en macrófagos serían semejantes a las citadas para neutrófilos, incluyendo alteraciones en la producción de ERO y en la actividad la Cu-Zn SOD (Cerone y col., 2000-b), aunque también se ha citado una menor expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (Saker y col., 1998). En terneros con hipocuprosis disminuye la concentración plasmática del factor de necrosis tumoral (TNF), lo cual explica porque los animales afectados pierden la capacidad de generar hipertermia durante la respuesta inmune (Gengelbach y col., 1997). Torre y col., (1995) observaron que las células mononucleares aisladas de vaquillonas deficientes en Cu producen menos interferón y tienden a producir menos interleucina (IL) 2 que aquellas provenientes de animales suplementados con Cu. La producción de IL1 no parece afectarse como causa de la deficiencia de Cu (Gengelbach y Spears., 1998).

La Cp, es una proteína de fase aguda con actividad ferro-oxidasa y su actividad se asocia al estatus de Cu del animal y por ende a su cupremia (Cerone y col., 1998). Por esta razón su actividad disminuye significativamente en estados de deficiencia (Cerone y col., 2000). La Cp es liberada desde el hígado en respuesta a un estímulo, sea una situación estresante o un proceso infeccioso (Tapiero y col., 2003; Cousins., 1985). Sin embargo, esta respuesta depende de un adecuado estatus de Cu en el animal, en este sentido, la deficiencia condicionada de Cu suplementando con Mo (relación Cu:Mo 1:2,5) y S (0,3 %), provoco una disminución en la concentración de Cp plasmática y un aumento en el Fibrinogeno plasmático, 48 hs post vacunación con herpes virus bovino tipo-1 (HVB-1) (Arthington y col., 1996).

Las consecuencias de la deficiencia de Cu sobre la inmunidad adaptativa son menos claras respecto de la inmunidad innata. Esto se manifiesta en la variabilidad de resultados informados por diferentes autores (Spears., 2000; Minatel y Carfagnini., 2000).

La inmunidad adquirida ha sido estudiada en animales con hipocuprosis evaluando especialmente tres aspectos: la respuesta inmune humoral, la respuesta inmune celular y la blastogénesis linfocitaria.

La inmunidad humoral ha sido estudiada evaluando la generación de anticuerpos en condiciones de deficiencia de Cu. Gengelbach y Spears., (1998) encontraron en terneros con hipocuprosis, generada por la suplementación con Mo en la dieta, una disminución en la generación de anticuerpos contra glóbulos rojos de porcino (GRP) durante la primoinoculación. Sin embargo, durante la segunda inoculación respondió con mayor producción de inmunoglobulinas el grupo suplementado con Cu y Mo (Gengelbach y Spears., 1998). En otro experimento, la segunda inoculación con GRP generó menos anticuerpos en terneros suplementados con Mo que en aquellos con deficiencia simple o condicionada por hierro, sin embargo el grupo suplementado con Cu también seroconvirtió menos que el control (Ward y col., 1997). Cerone y col., (1995) informaron que vaquillonas suplementadas con Mo y S e inmunizadas con cepa viva S1119 de *Brucella abortus* produjeron menor cantidad de IgG que los controles. En un desafío con virus de IBR y *Pasteurella haemolytica* en terneros con carencia simple de Cu, el grupo suplementado mejoró la producción de anticuerpos contra *Pasteurella*, aunque disminuyó el título de anticuerpos contra IBR a los 10 días post-inoculación (Stabel y col., 1993). Ward y Spears., (1999) informaron que la suplementación con Cu aumentó la respuesta inmune contra ovoalbúmina en terneros en crecimiento y contra GRP en terneros sometidos a estrés de ayuno y transporte, pero con igual tratamiento la respuesta inmune disminuyó en el grupo no sometido a estrés.

La respuesta inmune celular ha sido evaluada históricamente con las reacciones a mitógenos aplicados en la piel. Los resultados también han sido variables. En un



experimento con terneros suplementados con Mo, Fe y Cu, la suplementación con Cu disminuyó la respuesta a fitohemoaglutinina (PHA), mientras que en otro experimento los mismos autores lograron aumentar la respuesta a PHA en el grupo suplementado con Cu, aunque lo mismo ocurrió con aquel suplementado con Mo (Ward y col., 1997). Ward y col., (1993) informaron que la deficiencia de Cu por suplementación con Mo y S redujo la respuesta a PHA, y no encontraron la misma respuesta 6 años después, aunque reconocieron que en este experimento los animales tenían una carencia moderada (Ward y Spears., 1999).

Los estudios de proliferación o blastogénesis linfocitaria han sido evaluados en experimentos *in vitro* exponiéndolos a mitógenos inespecíficos o específicos para linfocitos T o B. Los resultados también son variables (Spears., 2000). Por un lado, terneros expuestos a la carencia de Cu y desafiados con virus de IBR no han respondido de manera diferente a PHA ni a pokeweed mitogen (PWM), o lo han hecho de manera errática (Stabel y col., 1993; Arthington y col., 1996). Por otro lado varios trabajos parecen indicar que el estatus de Cu en los animales o su suplementación en el medio de cultivo modifican la respuesta linfocitaria a PHA y PWM (Ward y Spears., 1993; Ward y col., 1997). Stabel y col., (1993) informaron que la proliferación celular bajo estimulación con PHA se ve favorecida por el agregado de  $\text{CuCl}_2$  al medio de cultivo, con mejor respuesta en los linfocitos obtenidos de terneros deficientes en Cu. Cerone y col., (1998) observaron en terneros con deficiencia condicionada por Mo (30 ppm) y S (225 ppm) una disminución en la cantidad de linfocitos B del 40 % y sólo del 7% en linfocitos T. Con este antecedente, posiblemente los mejores resultados de proliferación, con o sin agregado de Cu al medio, se obtengan evaluando estimulantes de linfocitos B, y no de linfocitos T como son PHA y Con A.

En base a lo expuesto, resulta claro que el estudio de las consecuencias inmunológicas de la hipocuprosis bovina se ha basado en trabajos realizados en condiciones experimentales diferentes y con niveles variables de deficiencia, lo cual impide extrapolar los resultados a rodeos de cría de la Cuenca del Río Salado, Argentina, Sin

embargo, el riesgo potencial de que tales fallas ocurran en condiciones productivas es elevado, especialmente en países como Argentina donde la producción de cría bovina se asienta en zonas con incidencia endémica de hipocuprosis. La evaluación de parámetros inmunológicos en rodeos afectados por hipocuprosis, generará la posibilidad de conocer si existe un riesgo potencial en animales naturalmente expuesto a la carencia, determinando en que momento del desarrollo de la hipocuprosis se ve afectado el sistema inmune, y en base a esto establecer el momento óptimo del tratamiento preventivo de la hipocuprosis.

**I-D) Fundamentos de la suplementación estratégica con cobre para evitar pérdidas productivas en terneros.**

La sucesión de trabajos de investigación en la Cuenca del Río Salado ha permitido ajustar un modelo de suplementación destinado a evitar menores ganancias de peso en terneros de cría. Como se presentara anteriormente, las menores ganancias de peso ocurren cuando los terneros agotan sus reservas hepáticas y llegan a tener cupremias menores a 30 µg/dl (Fazzio., 2006). Esta situación empeora en años lluviosos y se atenúa en años secos (Mattioli y col., 1998). Con estos fundamentos epidemiológicos, y un diagnóstico serológico previo, se recomienda en la zona una suplementación parenteral en la madre en el último tercio de gestación, y en los terneros entre los 3 y 4 meses de edad hasta el destete, variando los lapsos entre dosis con el nivel de lluvias en la zona (Rosa y col., 2006; Fazzio y col., 2006; Mattioli y col., 2007), a su vez estos autores recomiendan, hacer diagnóstico serológico con 10 muestras de plasma de terneros de 4 meses de edad. Si estos animales presentan valores normales de cupremia se recomienda no agregar la suplementación con Cu en el plan sanitario del establecimiento. Si en cambio el nivel de cupremia de los terneros de 4 meses indica carencia moderada (entre 30 y 60 µg/dl), se considera al establecimiento como de riesgo moderado, y se recomienda un plan de suplementación con una dosis de Cu a las madres en el último tercio de gestación y a los terneros una dosis entre los cuatro y los cinco meses de edad y otra al destete, con siete meses en promedio. Si la evaluación de cupremia en terneros de cuatro meses demostrara que los mismos llegan a esta edad con carencia severa (menos de 30 µg/dl), se considera al establecimiento de riesgo severo, y en ese caso se indican dos dosis durante la gestación a las madres y a los terneros tres dosis, una a los tres meses, la otra a los cinco meses y la tercera al destete. Este modelo de trabajo permite ajustar el diagnóstico por única vez, y la necesidad de ajuste queda restringida a los cambios meteorológicos, de modo que si el año

se presenta lluvioso se debe asumir que el riesgo aumenta, reajustando el plan sanitario (Mattioli., 2013).

El modelo de suplementación anterior, contempla sólo las menores ganancias de peso, pero se desconoce la existencia de otras fallas previas que anticipen o sean la causa de las anteriores, y en consecuencia deban ser anticipadas. Entre ellas, las fallas inmunológicas u otras alteraciones dependientes de Cu aún desconocidas, podrían estar pasando inadvertidas y no ser cubiertas por el modelo de suplementación mencionado. Se propone en el presente plan de tesis doctoral parámetros que alerten sobre la necesidad de ajustes al modelo mencionado o bien que ratifiquen su vigencia.

## **II - OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

### **II-A) Objetivo Principal.**

Evaluar el efecto de la carencia de Cu sobre diferentes parámetros subclínicos en terneros de cría.

### **II-B) Objetivos Específicos**

- ✓ Evaluar las consecuencias de la hipocuprosis en terneros sobre los parámetros hematológicos.
- ✓ Evaluar las consecuencias de la hipocuprosis en terneros sobre los parámetros inmunológicos.
- ✓ Evaluar la asociación entre todos los parámetros citados con las cuprenias y las pérdidas de peso en terneros con deficiencia de Cu.

### **II-C) Hipótesis más relevante.**

La hipocuprosis en terneros de cría produce alteraciones en parámetros hematológicos como el recuento de glóbulos rojos, la concentración de la hemoglobina, el hematocrito, el número de neutrófilos y linfocitos. Por otro lado, causa alteraciones inmunológicas, generando una disminución en la capacidad de proliferación de los linfocitos, reduce la producción de anticuerpos post vacunales, afecta la funcionalidad de los neutrófilos y altera la integridad del ADN de los linfocitos. Estos cambios preceden al efecto sobre el peso y se asocian a los niveles de cupremia del animal.

### III MATERIALES Y MÉTODOS

#### III-A) Diseño experimental

Se realizaron 2 experimentos. Durante 2011-2012 se llevó a cabo el primero, denominado **Experimento 1**, y durante 2012-2013 el segundo denominado **Experimento 2**. Ambos se realizaron en la Chacra Experimental Chascomús, perteneciente al Ministerio de la Producción, Provincia de Buenos Aires. El primer experimento se desarrolló en un periodo de precipitaciones escasas que no llegaron a generar encharcamiento en los potreros (desde el parto al destete las precipitaciones sumaron 660 mm), y el segundo se realizó en un periodo lluvioso que generó encharcamiento (desde el parto al destete las precipitaciones sumaron 920 mm) lo que se asoció a la presencia de hipocuprosis natural, a su vez las precipitaciones acumuladas entre el nacimiento de los terneros y el primer muestreo fueron de 226 y 540 mm para los experimentos 1 y 2 respectivamente lo que determinó la diferencia en el estatus de Cu de los animales al inicio de los experimentos, (Figura 5, Tabla 3)

Para cada experimento se utilizaron 40 terneros al pie de sus madres por un periodo de 120 días, sobre un sistema pastoril extensivo característico de la Cuenca del Río Salado, todos los animales del grupo estuvieron consumiendo el mismo forraje durante todo el experimento. Cada experimento se inició cuando los terneros tenían 3 meses de edad (noviembre del primer año), momento en el cual se estiman que pueden agotarse las reservas hepáticas de Cu que fueron aportadas por las madres durante la gestación. Se finalizó el Experimento 1 al destete (marzo de 2012) cuando los animales cambian de categoría y pasan a un sistema de cría. En el Experimento 2 se realizó el destete de los animales 20 días antes de la realización del último muestreo (20-03-2013) debido a falta de forrajes disponibles y los terneros pasaron a un sistema de confinamiento donde se suplementaron con silo de maíz, y 20 días después se realizó el cuarto muestreo.

Se realizaron dos tratamientos, uno **control** y otro **cobre**. A este último grupo de animales se le aplicó una dosis subcutánea de Cu (0,3 mg Cu/Kg de peso) en cada muestreo dentro de cada experimento.

Se utilizó Cu-EDTA, estas sales solubles liberan rápidamente el Cu desde su sitio de aplicación y pueden ser hepatotóxicas, esencialmente por su velocidad de transferencia (Giuliodori y col., 1997). Para el Cu-EDTA el límite de la dosis es de 1 mg/kg de peso (Allen y Mallinson, 1984). La dosis terapéutica de Cu inyectable es de 0,5 mg/kg, esta sería apenas la mitad de la tóxica, siendo riesgosa en animales pequeños que pueden ser dosificados dos veces en las condiciones de manga, donde usualmente son inyectados, o bien puede generar sobredosificaciones en los animales más pequeños del grupo, por tal motivo se decidió bajar la dosis a 0,3 mg/kg (Fazzio y col., 2010).

En ambos experimentos los terneros se bloquearon por sexo, quedando un total de 20 animales por tratamiento, 10 de cada sexo, para cada experimento. Los muestreos se realizaron cada 40 días. Este lapso fue establecido como el mínimo período de efecto terapéutico de una dosis de 0,3 mg/kg en terneros de cría en la Chacra Experimental (Fazzio y col., 2010). Se realizaron 4 muestreos por experimento, en los cuales se aplicaron los tratamientos, se pesaron los animales, se tomaron muestras de sangre para la determinación de las cupremias, parámetros inmunológicos (funcionalidad de los neutrófilos, índice mitótico e Índice de Daño del ADN de los linfocitos. parámetros hematológicos (hemograma completo), en este caso se utilizaron los valores de la fórmula leucocitaria absoluta, teniendo en cuenta que está asociada directamente a la fórmula leucocitaria relativa, por tal motivo los valores de esta última no se analizaron estadísticamente, a su vez el recuento de eosinófilos, basófilos y monocitos tampoco se analizaron porque la mayoría de los animales presentaban valor 0.

La respuesta vacunal a IBR se realizó solo en el experimento 2 debido a que en el primer experimento la vacuna utilizada no provocó una respuesta inmune a herpes virus bovino tipo 1 (BoHV-1). En el experimento 2 se cambió la vacuna, y hubo respuesta a BoHV-1. La

Primera dosis de vacuna (día 0) se aplicó en el muestreo 3, la segunda dosis se aplicó 20 días después (día +20), y las muestras de sangre para determinar el título de anticuerpos a BoHV-1 se extrajeron el día 0, día +20 y en el último muestreo (día + 40).



### **III-B) Métodos analíticos**

#### **III-b.1) Cupremias**

Se extrajeron 10 ml de sangre por animal en cada muestreo, las muestras de sangre heparinizadas se centrifugaron a 3000 rpm por 10 min. 1 ml de plasma de cada muestra se trasvasó a un tubo de 5 ml de vidrio y se agregó 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10%, se mezcló en vortex y los tubos posteriormente se centrifugaron a 7000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se trasvasó a tubos de 2 ml con tapa para realizar la lectura. La determinación de Cu plasmático se realizó por espectrofotometría de absorción atómica de llama (Perkin Elmer AAnalyst 200), utilizando una lámpara de Cu ajustada de acuerdo a las especificaciones del instrumento.

#### **III-b.2) Hemogramas**

Se tomaron 2,5 ml de sangre de 20 animales, 10 por tratamiento, las muestras de sangre refrigeradas y con anticoagulante (EDTA) fueron procesadas dentro de las 24 hs de la extracción, se realizó el recuento de eritrocitos, el hematocrito y concentración de hemoglobina, y en base a estos resultados se calcularon el volumen corpuscular medio, concentración de hemoglobina corpuscular media y hemoglobina corpuscular media. Se realizó el recuento de leucocitos, se determinó la fórmula leucocitaria relativa, y se calculó la fórmula leucocitaria absoluta en base a la relativa, estableciendo el valor absoluto de linfocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, y monocitos, al mismo tiempo se determinó la concentración de hemoglobina. Para la determinación de los parámetros sanguíneos se utilizó un autoanalizador con parámetros ajustados a bovinos (Mindray BC-6800).

#### **III-b.3) Funcionalidad de los neutrófilos**

Para evaluar la funcionalidad de los neutrófilos sólo se utilizaron 4 animales de forma aleatoria por tratamiento y por experimento, y luego fueron utilizados los mismos animales para cada muestreo, el número de animales fue determinado por cuestiones operativas,

minimizando las limitaciones de espacios y equipos de laboratorio. Se tomaron 50 ml de sangre por animal, la cual se transportó refrigerada en jeringas de extracción que contenían el anticoagulante Ácido Cítrico,- Citrato Dextrosa (ACD) en una relación ACD: sangre 1:10. En flujo laminar (ESCO Class II BSC), la sangre se trasvasó a tubos de fondo cónico de 50 ml estériles y libres de endotoxinas, que se centrifugaron por 30 minutos a 2600 rpm a 4°C , Se descartó el plasma y la capa de células blancas, y el paquete de glóbulos rojos con neutrófilos se suspendió en Solución Salina Balanceada de Hank (HBSS) Los tubos se centrifugaron por 30 minutos a 2600 rpm a 4°C, el sobrenadante y el resto de la capa de células blancas se descartó. Para generar hemólisis se utilizaron 30 ml de NaCl 0,03 M por tubo, y la osmolaridad se restituyó con 8 ml de NaCl 0,63 M. Luego se centrifugó por 10 minutos a 2000 rpm a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se repitió el proceso de hemólisis. Finalmente se obtuvo un “pellet” de neutrófilos luego de dos lavados con HBSS. Los neutrófilos se contaron en cámara de Neubauer y se prepararon en una concentración de  $10^7$ /ml. Posteriormente los neutrófilos fueron incubados con *Staphylococcus aureus* ( $10^8$ /ml), en una relación 1:4 neutrófilos:bacterias, y se determinó la capacidad de lisis y de fagocitosis. La primera se realizó a través de la reducción en el Plate Count Agar (PCA) pre y post desafío, y la capacidad fagocítica se evaluó mediante el recuento de bacterias luego de la tinción de los neutrófilos con May Grünwald-Giemsa post-desafío. Se contaron 100 células al microscopio óptico con aumento 100X y se determinó el porcentaje de células que fagocitaron.

#### **III-b.4) Índice mitótico de linfocitos**

La sangre total heparinizada se cultivó en suspensión en frascos de vidrio, en medio de cultivo Ham F10 (GIBCO) suplementado con 10 % de suero fetal bovino y antibióticos (penicilina 60 UI/ml y estreptomycin 50 µg/ml). La sangre se cultivó durante 53-54 hs a 37 °C, período en el que los linfocitos alcanzan la primera división mitótica luego de la estimulación con fitohemaglutinina (PHA). Dos horas y media antes de finalizar el tiempo de

incubación se adicionó colchicina a cada frasco, para frenar las mitosis (dosis final 1,0 µg/ml). La suspensión celular se centrifugó a 250x g durante 8 min. El sobrenadante fue descartado y se agregaron 5 ml de solución hipotónica (KCl 0,075M) dejando los tubos a 37 °C durante 20 min. Se centrifugó a 250 xg durante 8-10 min. , se eliminó el sobrenadante y se agregaron 5 ml de fijador preparado con tres partes de alcohol metílico y una parte de ácido acético glacial. Se realizaron varios cambios de fijador previa centrifugación y eliminación del sobrenadante. Una vez fijado, el material precipitado se guardó en heladera a 4 °C por 24 hs. Los preparados se realizaron colocando una gota, extendiéndola y secándola al aire. Posteriormente se colorearon con colorante de Giemsa al 5 % durante 7-8 min. Una vez secos se protegieron con cubreobjetos montados con DePex. Se analizaron en un microscopio óptico, donde se realizó el recuento de células en mitosis sobre un total de 1000 células (Células  $\%$ / $\%$ ).

### **III-b.5) Índice de daño de linfocitos**

Se realizó la electroforesis de células individuales en gel utilizando la versión alcalina descrita por Singh y col., (1988) con algunas modificaciones (Tice y Strauss, 1995). Los portaobjetos se cubrieron con una capa de 180 µl de agarosa al 0,5% de punto de fusión normal (Carlsbad, Carlsbad, CA, USA). Se tomaron 10 µl de las muestras de sangre y se mezclaron con 75 µl de agarosa de bajo punto de fusión al 0,5% (Carlsbad, Carlsbad, CA, USA), se distribuyeron sobre la capa de agarosa de punto de fusión normal y se cubrieron con cubreobjetos. Luego de la solidificación de la agarosa a 4°C durante 10 min., los cubreobjetos fueron removidos, los portaobjetos con las muestras fueron sumergidos en solución de lisis durante una noche a 4°C y finalmente equilibrados en una solución alcalina por 20 min. La electroforesis se realizó durante 30 min. a 25 V y 300 mA (1,25 V/cm). Luego de la corrida electroforética, los portaobjetos fueron neutralizados con tres lavados (5 min. cada uno) con TRIS (pH 7,5) y por último con agua destilada. Las muestras fueron teñidas con una solución 1/1000 de SYBR Green I (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) (Olive y

col., 1999). La evaluación y conteo de las células se realizó a 400X con un microscopio de fluorescencia (Olympus BX40, con filtro de 515-560 nm) conectado a una cámara de video (Sony 3 CCD-IRIS). Las células se clasificaron en células con o sin daño de acuerdo a si el ADN fragmentado migraba en el gel formando una “cola del cometa” luego de la electroforesis. Posteriormente, se evaluó la cantidad de ADN migrado y la longitud de la cola para clasificar a las células en cinco categorías o grados: grado 0 (cola no visible), grado 1 (cometas con cola delgada), grado 2 (cometas con cola difusa), grado 3 (cometas con colas bien definidas) y grado 4 (cometas con una clara disminución en el diámetro de la cabeza y con una cola bien definida) (Figura 4). Las unidades de valor de daño del ADN fueron establecidas arbitrariamente de acuerdo a lo propuesto por Collins (2004). El Índice de Daño del ADN (IDD) se obtuvo de la siguiente manera: se evaluaron 100 cometas y a cada uno se le asignó un valor de 0 a 4 (según la clasificación de grados citada) por lo cual el valor total para el portaobjetos fue de 0 a 400 “unidades arbitrarias” (Collins, 2004).

### **III-b.6) Respuesta vacunal a IBR**

Los anticuerpos neutralizantes de herpes virus bovino tipo-1 (BoHV-1) se detectaron por medio de la prueba de virus neutralización (VN), usando el método virus constante, suero variable. (Parreño y col., 2010) para lo cual se utilizó una placa de cultivo celular de 96 pocillos. Los sueros se diluyeron en base 2 en medio de cultivo celular hasta una dilución final de 1/1024, colocando 50 µL por pocillo y 3 pocillos por dilución de la mezcla suero-medio, en la prueba también se incluyen diluciones de un suero control positivo, y de un control negativo. Se utilizó un pocillo adicional con suero sin diluir como control de la toxicidad de los sueros. Se añadió 50 µl por pocillo del stock del BoHV-1 diluido en medio de cultivo de modo de obtener 100–200 DICT<sub>50</sub> (50% Tissue Culture Infective Dose) por pocillo. En los pocillos de control de la toxicidad, se añaden 50 µl del medio de cultivo en lugar de virus. La mezcla de suero y virus se incubó a 37°C por 24 hora antes de agregar 100 µl de

la solución de células MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney Epithelial Cells) para lograr tener 3 a  $5 \times 10^4$  células/pocillo, luego las placas se incuban de 3 a 5 días a 37 °C. Los resultados se expresaron como negativos, cuando presentaban efecto citopático, es decir el suero no contenía anticuerpos neutralizantes, y positivos sin efecto citopático debido a la presencia de anticuerpos neutralizantes, y en este caso se determinó el título hasta el cual se inhibió el efecto citopático y se aplicó  $\log_{10}$  a la inversa de la última dilución sin efecto citopático, y de esta forma se expreso el titulo obtenido por cada animal, los animales se consideraron positivos a BoHV-1 (respondieron a la vacuna) a partir de la dilución 1/8 y negativos por debajo (Romera y col., 2001).

### **III-C) Análisis estadístico de los resultados.**

Los datos obtenidos fueron analizados usando el software estadístico SAS versión 9.0, utilizando el modelo mixto completamente aleatorio con un diseño de medidas repetidas en el tiempo, considerando la Cupremia como variable independiente, y como variables dependientes se consideró a: peso, hemograma, funcionalidad de los neutrófilos, índice de daño del ADN, índice mitótico y respuesta a la vacuna de IBR. Se utilizó la herramienta “slice” con el fin de evaluar las diferencias para cada muestreo. El análisis estadístico de cada experimento se realizó por separado, debido a que la presentación de la hipocuprosis estaba condicionada por los niveles de lluvia, y estos fueron diferentes en los experimentos 1 y 2, a su vez los experimentos no fueron iguales en diseño debido a que en el experimento 2 se realizó el destete de los animales 20 días antes del último muestreo.

## **IV - RESULTADOS**

### **IV-A) Cupremias**

Los niveles de cupremia para el Experimento 1 y para el Experimento 2 se presentan en la Tabla 3. En ambos experimentos las diferencias por tratamiento, muestreo e interacción fueron altamente significativas ( $P < 0,01$ )

En el experimento 1 se observó una tendencia entre los grupos en el primer muestreo ( $P < 0,10$ ), donde el grupo control presentaba una cupremia superior, esta diferencia se invirtió en el muestreo 2 y continuo de esta forma hasta el final del experimento ( $P < 0,05$ ).

En el experimento 2 los animales de ambos tratamientos comienzan con carencia severa de Cu sin mostrar diferencias entre ellos ( $P > 0,10$ ), luego los grupos se diferencian, el grupo cobre pasa a la categoría normocupremico permaneciendo de esta forma hasta terminar, pero el grupo control sigue dentro de la categoría de deficiencia severa durante el muestreo 2 y 3, para pasar a normocupremico en el muestreo 4 ( $P < 0,05$ ).

### **IV-B) Parámetro productivo**

#### **VI-b.1 Peso vivo**

Para el Experimento 1 no hubo efecto del tratamiento ni de la interacción con tiempo sobre el peso vivo de los animales ( $P > 0,08$ ), el peso de los animales aumento con el transcurso del tiempo ( $P < 0,01$ ), evidenciado a observar el peso promedio para cada muestreo (Tabla 4).

En el experimento 2 se observa efecto del tratamiento ( $P < 0,05$ ), y al observar cada muestreo en particular vemos que al muestreo 1 no hay diferencias entre tratamientos, pero al muestreo 2 hay una tendencia de 12 kg a favor del grupo cobre ( $P < 0,10$ ), luego al tercer muestreo la diferencia es de 15 kg ( $P < 0,05$ ), y esta diferencia se acrecienta aún más en el muestreo 4 mostrando 18 kg de diferencia a favor del grupo cobre ( $P < 0,05$ ). El peso de los animales se incrementó en relación con el tiempo ( $P < 0,01$ ), pero el incremento en relación al paso del tiempo fue diferente para los distintos tratamientos ( $P < 0,01$ ) (Tabla 4).

## **IV-C) Parámetros hematológicos**

### **IV-c.1) Hemograma eritrocitario**

#### **IV-c.1.a- Recuento de glóbulos rojos**

Los resultados se presentan en la Tabla 5, donde se muestra que no hay efecto del tratamiento sobre el recuento de glóbulos rojos en ningún experimento, en el Experimento 1 y en el experimento 2 se observa que el recuento de eritrocitos fue distinto a medida que pasa el tiempo ( $P < 0,01$ ), y a su vez en el experimento 1 hay una tendencia en la interacción tiempo por tratamientos sobre el recuento de eritrocitos ( $P < 0,15$ ), en este sentido vemos que ambos tratamientos comienzan con valores similares al muestreo 1 y continúan así en el muestreo 2 sufriendo una caída en el recuento de  $1 \times 10^6$  eritrocitos/ml de sangre en ambos grupos al muestreo 3. Al muestreo 4 el grupo control presentó un recuento similar al observado en el muestreo anterior, mientras que el grupo cobre mostró un incremento de  $0,5 \times 10^6$  eritrocitos/ml de sangre que no llega a ser significativo ( $P > 0,10$ ). Para el experimento 2 no hay efecto de la interacción tiempo por tratamiento ( $P > 0,60$ ).

#### **IV-c.1.b- Hematocrito**

Durante el Experimento 1 no hubo efecto del tratamiento ( $P > 0,70$ ), pero el hematocrito fue diferente a medida que pasaba el tiempo ( $P < 0,01$ ) y esta variación del hematocrito en relación al tiempo mostró una tendencia a ser diferente entre los tratamientos ( $P = 0,11$ ), en este sentido puede observarse que pese a no haber diferencias, al comienzo del experimento el hematocrito del grupo control estaba un punto por encima del grupo cobre, y esta diferencia se fue invirtiendo en el transcurso del experimento para terminar con una diferencia de 1,7% en favor del grupo cobre. (Tabla 6).

En el Experimento 2 hay efecto del tratamiento ( $P < 0,05$ ), y podemos ver que al comienzo del experimento los grupos arrancan con un hematocrito similar ( $P > 0,10$ ), pero al siguiente muestreo se diferencian los tratamientos en favor del grupo cobre ( $P < 0,05$ ), esta diferencia se incrementó al muestreo 3 ( $P < 0,05$ ), y al cuarto muestreo la diferencia

disminuyo debido a un marcado incremento del hematocrito del grupo control, donde hubo tendencia entre tratamientos ( $P < 0.10$ ), como acabamos de mencionar el hematocrito se modificó con el paso del tiempo ( $P < 0.05$ ), pero no hubo diferencia del hematocrito en relación al tiempo al comparar entre los tratamientos ( $P > 0.30$ ) (Tabla 6).

#### **IV-c.1.c- Concentración de hemoglobina**

En el Experimento 1 no hubo efecto del tratamiento ( $P > 0.40$ ). La concentración de hemoglobina fue diferente entre muestreos ( $P < 0.01$ ), aunque las diferencias de la concentración de hemoglobina con el paso del tiempo no mostro diferencias entre tratamientos ( $P = 0.16$ ), en este sentido puede observarse como la concentración de hemoglobina tuvo un comportamiento similar entre los tratamientos desde el muestreo 1 al 3 ( $P > 0.10$ ), pero al muestreo 4 hay una tendencia donde el grupo cobre presenta 0,57 mg/dl por encima del grupo control ( $P < 0.10$ ) (Tabla 7).

Experimento 2 el hay efecto del tratamiento sobre la concentración de hemoglobina ( $P < 0.01$ ), y esta diferencia se hace evidente ya al muestreo 2 y permanece en el muestreo 3, donde el grupo cobre presenta una concentración mayor de hemoglobina, pero ya no se observa esta diferencia en el muestreo 4. La concentración de hemoglobina fue distinta entre muestreos ( $P = 0.01$ ), y no hubo efecto de la interaccion tiempo por tratamiento sobre la concentración de hemoglobina ( $P = 0.38$ ) (Tabla 7).

#### **IV-c.1.d- Volumen corpuscular medio (VCM)**

En el experimento 1 no hay efecto del tratamientos ni de la interaccion tratamiento por tiempo ( $P > 0.70$ ), pero se observa una diferencia entre muestreos ( $P < 0.01$ ) (Tabla 8).

En el experimento 2, Hay efecto del tratamiento ( $P < 0.01$ ), y la diferencia entre los tratamientos se observa al cuarto muestreo, donde el grupo cobre presenta un VCM mayor ( $P < 0.05$ ), a su hay diferencias entre muestreo ( $P = 0.02$ ) (Tabla 8).

#### **IV-c.1.e- Concentración de hemoglobina corpuscular media (CHbCM)**

En el Experimento 1 no hay efecto del tratamiento ( $P = 0.13$ ), pero la CHbCM fue distinta entre muestreos ( $P < 0.01$ ), aunque esta variación entre muestreos fue similar entre



los tratamientos ( $P>0,50$ ), sin embargo puede observarse que en el muestreo 3 hay una diferencia significativa entre los tratamientos, donde el grupo cobre se encuentra un punto por encima del control ( $P<0,05$ ). En el Experimento 2 hay tendencia del tratamiento ( $P=0,09$ ), y al observar la evolución de esta variable se ve que al tercer muestreo se hay una tendencia donde el grupo cobre presenta menor CHbCM ( $P<0,10$ ), pero no hay diferencias en la interacción tratamiento con tiempo ( $P>0,40$ ), aunque si se observa efecto del muestreo ( $P<0,01$ ) (Tabla 8).

#### **IV-c.1.f- Hemoglobina corpuscular media (HbCM)**

En el experimento 1 no hay efecto del tratamiento ni de la interacción del tratamiento con el tiempo sobre la HbCM ( $P>0,20$ ), pero si hay diferencias entre muestreos ( $P < 0,01$ ), mientras que en el Experimento 2 hay efecto del tratamiento y del tiempo ( $P<0,01$ ), pero no de la interacción tratamiento con tiempo, y la diferencia entre grupos se hace evidente al muestreo 4, donde el grupo cobre presenta mayor HbCM ( $P<0,05$ ) (Tabla 8).

#### **IV-c.2) Hemograma leucocitario**

##### **VI-c.2.1) Recuento de leucocitos**

En el experimento 1 y 2 no hay efecto del tratamiento ( $P>0,40$ ), el recuento de leucocitos entre muestreo se comportó de forma similar para el experimento 2 ( $P>0,10$ ) pero hubo una tendencia entre muestreos solo para el experimento 1 ( $P=0,10$ ). (Tabla 9).

##### **VI-c.2.2) Fórmula leucocitaria absoluta**

###### **VI-c.2.2.1) Recuento de linfocitos**

En el experimento 1 y 2, el tratamiento, y la interacción tratamiento con tiempo, no tuvieron efecto sobre el recuento de linfocitos ( $P>0,50$ ) y ( $P>0,15$ ) respectivamente. En el experimento 1 se observa que hay una tendencia al primer muestreo donde el grupo cobre presenta un recuento superior al control ( $P<0,10$ ), a su vez el recuento de linfocitos se comportó diferente entre muestreos ( $P<0,01$ ). Los recuentos de linfocitos en el experimento 2 fueron similares entre muestreos ( $P>0,40$ ). (Tabla 9).

#### **VI-c.2.2.2) Recuento de neutrófilos**

Durante el Experimento 1 no hubo efecto del tratamiento pero si del muestreo ( $P<0,01$ ) y de la interacción del tratamiento con tiempo sobre el recuento de neutrófilos ( $P=0,02$ ). Al puntualizar por muestreo se observó que al tercer muestreo hubo diferencias, siendo el recuento en el grupo Cobre ampliamente superior al Control ( $P<0,05$ ) (Tabla 9).

Durante el Experimento 2 no hubo efecto del tratamiento ( $P=0,50$ ), hay efecto del muestreo ( $P=0,04$ ), pero la interacción del tratamiento con el tiempo no mostro diferencias ( $P>0,90$ ) (Tabla 9).

#### **IV-D) Parámetros inmunológicos**

##### **IV-d.1) Funcionalidad de los neutrófilos**

###### **IV-d.1.1) Capacidad lítica de los neutrófilos**

La capacidad lítica de los neutrófilos no se vio afectada ni por el tratamiento ni por la interacción tratamiento con tiempo, pero si por el muestreo tanto en el Experimento 1, como el 2. En ambos experimentos tampoco se observaron diferencias entre tratamientos en ningún muestreo en particular (Tabla 10).

###### **IV-d.1.2) Capacidad fagocítica de los neutrófilos**

En el Experimento 1 y 2 la capacidad fagocítica no evidenció diferencias atribuibles al tratamiento ( $P>0,50$ ), aunque si fueron significativas las diferencias debidas al muestreo ( $P<0,03$ ), y en Experimento 1 hay efecto de la interacción del tratamiento con el tiempo ( $P=0,02$ ) (Tabla 10).

##### **IV-d.2) Funcionalidad de los linfocitos**

###### **IV-d.2.1) Índice de daño del ADN de los linfocitos**

En el experimento 1 hay diferencia por tratamiento ( $P<0,01$ ), y esta diferencia se hace evidente recién en el muestreo 4 donde el grupo cobre presenta una marcada disminución del índice de daño, mientras que el control permanece con un índice de daño

similar a los muestreos anteriores ( $P < 0,05$ ), a su vez el índice de daño fue distinto entre muestreos ( $P < 0,01$ ) y esta variación fue distinta entre tratamientos ( $P < 0,01$ ). En el experimento 2 el índice de daño fue igual en los primeros dos muestreos, y al muestreo 3 se diferencian, donde el grupo cobre muestra un índice de daño inferior al control ( $P < 0,05$ ), y esta diferencias se acrecienta al cuarto muestreo ( $P < 0,05$ ), por lo cual hay efecto del tratamiento ( $P < 0,01$ ), a su vez el índice de daño fue distinto entre muestreos ( $P < 0,01$ ) y la interacción del tratamiento con el tiempo fue diferente, donde los tratamientos comienzan iguales y finalizan marcadamente distintos ( $P < 0,01$ ) (Tabla 11).

#### **IV-d.2.2) Índice mitótico de los linfocitos**

Durante el Experimento 1 hubo efecto del tratamiento, muestreo e interacción con tiempo (Tabla 11). Al compararse los tratamientos en cada muestreo se observa que al muestreo 1 y 3 hay diferencias significativas con un mayor índice mitótico para el grupo control, y al cuarto muestreo hay diferencias significativas, donde el grupo Cobre presenta un índice mitótico mayor.

Durante el Experimento 2 hay efecto del tratamiento, pero no del muestreo e interacción (Tabla 11), y al evaluar cada muestreo se aprecia que los grupos comenzaron el experimento con diferencias significativas y permanecieron las diferencias a lo largo de todo el experimento, (Tabla 11).

#### **IV-d.2.3) Respuesta humoral a la vacuna de IBR**

Al evaluarse el comportamiento de los tratamientos en cada muestreo se observa que ambos grupos al día 0 no tienen diferencias, pero luego el grupo Cobre presenta una respuesta mayor al día +20 en relación al grupo control ( $P < 0,05$ ), pero esta diferencias se pierde al día +40, por tal motivo hay efecto del tratamiento ( $P = 0,05$ ), y los títulos fueron distintos a medida que paso el tiempo ( $P < 0,01$ ), y en este sentido el comportamiento fue distinto entre los tratamientos ( $P = 0,07$ ) (Tabla 12).

En la Tabla 13 se presenta el comportamiento de la respuesta a la vacuna de IBR por tratamiento, registrando el porcentaje de animales por título y muestreo, y se puede

apreciar que ningún animal presentaba anticuerpos antes de la vacunación y luego al día +20 el 70 % de los animales del grupo Cobre eran positivos, mientras que en el grupo Control sólo el 30 % eran positivos. Al día +40, el 100 % de los animales eran positivos en ambos grupos, pero al distribuirlos por categoría, dentro de los positivos vemos que el grupo Control presentaba un 50 % de los animales en la dilución más baja, contra un 20 % para el grupo Cobre.

## V – DISCUSIÓN

El estudio sobre el comportamiento de las cupremias en el experimento 1 muestra una tendencia al primer muestreo, donde el grupo control presenta una cupremia de 61  $\mu\text{g/dl}$ , lo que representa 9  $\mu\text{g/dl}$  por encima del grupo cobre, esta situación se invierte gracias a la aplicación de Cu, y al siguiente muestreo 40 días después el grupo cobre presenta una cupremia de 78  $\mu\text{g/dl}$ , 14  $\mu\text{g/dl}$  de cupremia mayor que el control ( $P < 0.05$ ), pero los animales de ambos tratamientos permanecen normocupremicos, hasta el cuarto muestreo, donde el control presenta una carencia severa de cobre (Tabla 3), esta caída se relaciona a las altas precipitaciones entre el tercer y cuarto muestreo donde el registro acumulado de precipitaciones alcanza los 300 mm (Figura 5), lo que genera una disminución en el aporte de Cu de los forrajes en la cuenca del río Salado (Ramírez y col., 1998; Mattioli., 1998).

En el experimento 2 ya al inicio las cupremias están en el rango de deficiencia severa de Cu para ambos tratamientos sin mostrar diferencia entre ellos ( $P > 0.10$ ) (Tabla 3). Esto se asocia a altas precipitaciones (Figura 5), 540 mm registrados desde el nacimiento de los terneros hasta el inicio del experimento provocando que los forrajes aporten un bajo nivel de Cu (Ramírez y col., 1998; Mattioli., 1998). Al siguiente muestreo el grupo cobre se diferencia del control en 44  $\mu\text{g/dl}$  de Cu en plasma lo que representa un incremento de 50  $\mu\text{g/dl}$  de Cu en relación al primer muestreo, esta diferencia es generada por la aplicación parenteral de Cu del primer muestreo (Tabla 3), las diferencias se mantuvieron hasta el cuarto muestreo donde se evidencia un aumento en las cupremias para ambos grupos, donde el grupo control pasa a estar en el rango de normocupremia, aunque las diferencias entre tratamientos aún se mantienen, este incremento en los valores de cupremias se debieron a un aumento en el aporte de cobre en la dieta, debido a que 20 días previos al último muestreo los animales se destetaron y pasaron a comer un suplemento.

Para ambos experimentos se observa el efecto del tratamiento sobre las cupremias ( $P < 0.01$ ), donde vemos que la aplicación de Cu cada 40 días mantuvo diferente las cupremias

entre los tratamientos y a su vez en el experimento 2 fue adecuado para que los animales pasen de una deficiencia severa de Cu a normocupremicos para el resto del experimento (Tabla 3). La evaluación de las cupremias entre experimentos indica que la deficiencia de cobre fue significativamente más grave en el experimento 2, y la diferencia radica en que los terneros nacen siempre con una reserva hepática de Cu destinada a cubrir la etapa de lactancia, debido a que la leche materna es deficiente en Cu (Suttle., 2010). Superada la etapa de lactante los terneros dependen del aporte de Cu en la dieta, y es en esta situación donde se establece la diferencia entre los experimentos. Como se menciona arriba las precipitaciones heterogéneas entre los experimentos generaron diferente aporte de cobre de los forrajes (Figura 5), determinando el comportamiento de las cupremias para ambos experimentos (Tabla 3), y esto se asoció al distinto comportamiento que muestran las variables independientes entre los experimentos, que discutiremos a continuación.

Posiblemente la consecuencia productiva más grave de la hipocuprosis en terneros sea el crecimiento sub-óptimo provocando pérdida de kilos en el sistema de cría (Suttle., 2010). En el presente trabajo, las diferencias de peso se encontraron solo durante el Experimento 2, coincidiendo con los niveles más bajos de cupremias. En una serie de experimentos de suplementación, Fazzio., (2006) estableció que las fallas en el crecimiento ocurren cuando los animales alcanzan y permanecen dentro del rango de hipocupremia severa ( $< 30 \mu\text{g/dl}$ ). Estos antecedentes coinciden completamente con los resultados de los experimentos 1 y 2. En el primero, los animales del grupo Control alcanzaron el rango de hipocupremia severa sólo al momento del cuarto muestreo, cuando finalizaba el experimento, por lo cual no permanecieron en el rango de riesgo y no se registraron diferencias de peso (Tabla 3 y 4). En el Experimento 2, los animales del grupo Control debieron mantenerse en hipocupremia severa para llegar a manifestar una disminución de peso con respecto al grupo suplementado, aunque ya al muestreo 2 se observa una tendencia donde el grupo cobre presenta 12 kg más que el control, recién al muestreo 3 las diferencias son significativas, 15 kg de diferencia en favor del grupo cobre (Tablas 3 y 4). En

este caso existió una permanencia dentro del rango de hipocupremia severa de 82 días. Este resultado se asemeja al informado por Fazzio y col., (2010) de 60 días como requerimiento para que la hipocuprosis genere pérdidas de crecimiento, a su vez al cuarto muestreo las diferencias siguieron e incluso se incrementaron, donde el grupo cobre presento 18 kg más que el control, pese a que los animales del grupo control se encontraban en el rango de normocupremia para dicho muestreo, en este sentido, estudios previos ya han demostrado que las cupremias pueden descender antes de que ocurran las consecuencias productivas de la carencia (Suttle., 2010), o aún aumentar sin que esto signifique que el animal ya superó todas las consecuencias. Mattioli., (2013) demostró que hasta 30 días luego de terminados los ensayos de suplementación, los terneros con menores GDP no lograban alcanzar las ganancias de peso del grupo suplementado. Por otro lado al relacionar la cupremia con el peso vemos la asociación directa que existe entre estas variables, ya que el coeficiente de correlación fue de 0,62 ( $P<0,01$ ).

De la evaluación de los parámetros hematológicos surge que la concentración de hemoglobina y el porcentaje de Hto se comportan como indicadores sensibles de las variaciones de cupremia (Tabla 6 y 7), aunque en el presente experimento no pudo observarse una verdadera anemia, ya que los porcentajes de Hto nunca descendieron del rango de normalidad para los bovinos, de 24 a 46% (Kaneko y col., 1999).

La hemoglobina parece ser una variable que se afecta tempranamente en relación a la hipocupremia en bovinos, debido a que en el experimento 1 donde la deficiencia severa de Cu se presentó recién en el muestreo 4 (Tabla 3), la hemoglobina presento una tendencia a ser mayor para el grupo cobre en dicho muestreo ( $P<0,10$ ) (Tabla 7), y al segundo experimento cuando la deficiencia severa de Cu se manifiesta desde el muestreo 1 (Tabla 3), vemos que la aplicación de Cu generó un incremento en la concentración de hemoglobina para el grupo cobre que se diferenció del control ( $P<0,05$ ) (Tabla 7), a su vez se puede observar como la hemoglobina aumento al muestreo 4 en coincidencia con el

incremento de la cupremia del grupo control (Tabla 3), lo que evidencia la asociación directa entre estas variables, con un coeficiente de correlación de 0,55 ( $P < 0,01$ ).

Para el caso del hematocrito (Tabla 6) vemos que durante el experimento 1 no hubo efecto pese a que en el muestreo 4 se registra una deficiencia severa de Cu (Tabla 3), pudiendo establecer que el efecto de la deficiencia de cobre sobre el hematocrito requiere un lapso más prolongado de hipocuprosis, si lo comparamos con la hemoglobina, ya que durante el experimento 2 las diferencias en favor del grupo cobre se hacen evidentes ya al segundo muestreo donde el grupo cobre presenta un hematocrito superior al control ( $P < 0,05$ ), estableciendo a esta variable como un indicador temprano de deficiencia de cobre, a su vez vemos que el hematocrito aumenta rápidamente cuando la cupremia se eleva, ya que al muestreo 4, donde el grupo control presenta valores de normocupremia, el hematocrito aumenta 4,1 comparado con el muestreo anterior, por tal motivo queda evidente una asociación directa entre la cupremia y el hematocrito, con un coeficiente de correlación de 0,46 ( $P < 0,01$ ) (Tabla 6).

Los porcentajes de Hto promedio en el Experimento 2 fueron de 38,6 y de 35,9 para los grupos cobre y control respectivamente ( $P < 0,01$ ). Estos valores coinciden con informes previos obtenidos en la Cuenca del Río Salado (Rosa y col., 2006). Estos autores encontraron porcentajes de Hto de 37,6 y 35,2 % ( $P < 0,05$ ) para los grupos suplementados y no suplementados con Cu respectivamente.

Si bien la disminución del Hto como una consecuencia temprana de la hipocuprosis coincide con informes previos en la zona (Fazzio y col., 2010), contradice otros trabajos donde se informa la anemia como una consecuencia tardía en la patogenia de la deficiencia (Underwood., 1981). En este sentido, Campbell y col., (1974) y Humphries y col., (1983) provocaron severas hipocuprosis sin llegar a detectar cambios en la concentración de hemoglobina ni en el hematocrito. Gengelbach y col., (1994) indujeron la hipocuprosis, con excesos de Fe y Mo, en vaquillonas y en sus crías, y solamente los terneros con dietas excesivas en Mo presentaron disminución del Hto a los 6 meses de tratamiento. En este



sentido los resultados obtenidos en relación a la concentración de hemoglobina y hematocrito son distintos a los hallazgos previos en bovinos, a su vez el VCM (Tabla 8) que representa la relación entre el hematocrito y el recuento de eritrocitos no fue afectado durante el experimento 1, pero fue más bajo para el grupo control durante el experimento 2, lo que se puede asociar a una anemia microcítica, y la HbCM que relaciona la CHbCM con el recuento de eritrocitos no se afectó por el tratamiento durante el experimento 1, pero fue menor para el grupo control durante el experimento 2, pudiendo asociarse con una anemia hipocromica. De estos resultados se desprende que la deficiencia de cobre en bovinos causo alteraciones hematológicas similares a las provocadas por una deficiencia de hierro (Kaneko y col., 1999), Sin embargo, una revisión de Suttle., (2010) informa que las mismas son de tipo hipocrómica y microcítica en corderos, similar a la anemia ferropriva, pero en ovejas y vacas sería hipocrómica pero macrocítica, lo cual no se asemeja a los resultados obtenidos en estos experimentos.

La causa de la anemia durante la hipocuprosis, se ha asociado a la menor actividad de dos enzimas con actividad ferroxidasa, la Cp y la Hefaestina, necesarias para la movilización del Fe desde el hígado y desde el intestino, respectivamente (Bonham y col., 2002), esto concuerda con los resultados de Mills y col., (1976), quienes detectaron un aumento en la concentración de Fe en el hígado al disminuir la concentración de la Cp plasmática. En el mismo sentido, estos autores consideran que los cambios en la concentración de Hb no son suficientemente importantes como para otorgarles valor diagnóstico

La carencia de Cu y su asociación con fallas en la hemopoyesis tomó importancia últimamente en medicina humana, cuando se encontraron síndromes mielopoyéticos (Haddad y col., 2008), con pancitopenia (Imataki y col., 2008) y anemias macrocíticas (Angotti y col., 2008) en pacientes con severas deficiencias de Cu. Si bien los autores sugieren las causas que ya se citaron, otros nuevos hallazgos resultan interesantes. En este

sentido se ha demostrado que la carencia de Cu inhibe la diferenciación y la multiplicación de las células progenitoras hematopoyéticas CD34 (+) (Lazarchick., 2012).

Por otro lado, la disminución temprana del porcentaje de Hto sugiere otra posible causa. Esta podría ser un aumento en el daño oxidativo generado por fallas en las defensas antioxidantes dependientes de Cu (Sukalski y col., 1997; Attri y col., 2006). Cuando la membrana del eritrocito se altera por daño oxidativo o bien manifiesta alteraciones incipientes de apoptosis, como la exposición de fosfatidilserina en la membrana externa, se estimula su degradación por los tejidos hemocaterético (Föller y col., 2008). La posibilidad de alteraciones oxidativas en el inicio de las deficiencias de Cu parece ratificarse en los resultados del ensayo cometa en el presente trabajo, y que son discutidos más adelante.

Del análisis del hemograma leucocitario, el recuento de neutrófilos y linfocitos no presentó diferencias entre tratamientos, lo cual coincide con algunos antecedentes bibliográficos (Cerone y col., 1998). En términos generales se asume que se alteran antes las capacidades funcionales que la cantidad de células circulantes (Cerone y col., 2000-a, 2000-b).

Cuando se evaluaron parámetros funcionales de leucocitos se obtuvieron resultados significativos en los linfocitos, pero no en los neutrófilos. Estos últimos no evidenciaron diferencias en las capacidades fagocíticas o líticas en ningún experimento, a pesar de evidenciarse niveles importantes de carencia, especialmente en el Experimento 2.

Estos resultados contrastan con trabajos originales que indicaban la funcionalidad de los neutrófilos eran de las primeras consecuencias de la hipocuprosis (Mills., 1987). Los antecedentes incluyen fallas en la actividad fagocítica y lítica (Boyne y Arthur., 1986; Xin y col., 1991; Cerone y col., 1998). Sin embargo, existen trabajos que no encuentran alteradas estas funciones (Stabel y col., 1993; Arthington y col., 1995; Gengelbach y col., 1997). Estas diferencias podrían deberse al uso de diferentes microorganismos en las pruebas *in vitro* y posiblemente al uso de animales con diferentes niveles de deficiencia durante los experimentos. De cualquier modo, parece haber acuerdo en que las funciones de los

neutrófilos se ven afectadas por la pérdida de su capacidad de producir ERO (Stabel y col., 1993) junto con un deterioro de sus defensas antioxidantes (Xin y col., 1991; Gengelbach y col., 1997; Cerone y col., 2000-a). Considerando que la sensibilidad en la identificación de alteraciones en la carencia de Cu mejoraría su diagnóstico, este indicador merece ser desestimado en tal sentido.

En el Experimento 1 el índice de daño mostró una elevada sensibilidad como indicador del estatus de Cu, ya que cuando los grupos se diferenciaron en los niveles de cupremias durante el cuarto muestreo (Tabla 3), coincidió con que el índice de daño fue significativamente mayor en el grupo Control. Durante el Experimento 2 los grupos Cobre y Control se diferenciaron por sus cupremias desde el segundo hasta el cuarto muestreo, y durante estos dos últimos el índice de daño también diferenció entre ambos, evidenciando nuevamente mayor daño en el grupo control, y en este sentido esta variable fue la que primariamente mostro una diferencia entre tratamientos.

El índice mitótico, también fue afectado por el tratamiento, pero el comportamiento de esta variable fue distinto entre los experimentos, ya que durante el experimento 1 se observa que al muestreo 3 el grupo control presento un índice mitotico mayor que el cobre, pero al siguiente muestreo esta diferencia se invierte, y al evaluar lo sucedido en el experimento 2 se observa que los tratamientos comienzan distintos y esta diferencia se mantiene durante todo el experimento, con lo cual el índice mitotico no arrojo resultados concluyentes .

El ensayo cometa pone en evidencia y cuantifica fragmentaciones del ADN (Singh y col., 1988). Las mismas pueden ser debidas a daños oxidativos y fallas en los mecanismos de reparación secundarios a la carencia de Cu (Picco y col., 2004-a). Por esta razón el ensayo cometa ya ha demostrado asociarse al estatus de Cu en bovinos, y representa el primer indicador de daño de la hipocuprosis (Picco y col., 2001; Picco y col., 2004-b). Cuando esta técnica intenta asociarse a las variaciones de peso, surge en el Experimento 1 que diferencia los grupos de manera prematura, cuando aún estos no se diferencian en sus

pesos. En el Experimento 2, en cambio, coinciden las pérdidas de peso con los mayores niveles de daño en los muestreos 3 y 4, que conducen a las menores ganancias de peso en el cuarto muestreo. Considerando en conjunto los resultados de ambos experimentos, y entendiendo que esta técnica es sencilla, poco costosa y objetiva cuando se emplean mediciones computarizadas, el experimento cometa resulta una herramienta sensible en el diagnóstico de riesgo de pérdidas productivas por hipocuprosis, cuando es posible la comparación con un grupo control.

Los resultados del índice mitótico coinciden con los antecedentes variables presentados en la bibliografía, ya sea con resultados negativos (Stabel y col., 1993; Arthington y col., 1996; Spears., 2000) o positivos (Ward y Spears., 1993; Ward y col., 1997). Cerone y col., (1998) observaron en terneros con deficiencia condicionada por Mo y S una disminución en la cantidad de linfocitos B del 40 % y sólo del 7% en linfocitos T, desde el inicio del tratamiento hasta lograr deficiencia de Cu. Con este antecedente, posiblemente los mejores resultados de proliferación, con o sin agregado de Cu al medio, se obtengan evaluando estimulantes de linfocitos B, y no de T. Esta alternativa coincide con los resultados obtenidos en la respuesta a anticuerpos vacunales a IBR, discutidos a continuación.

La respuesta a la vacunación con IBR demostró que la carencia de Cu generó fallas en la primovacunación, evaluada a los 20 días de la primera dosis de vacuna, y estas diferencias desaparecieron 20 días después de la segunda dosis (tabla 12). Un factor importante para la interpretación de estos resultados es que la diferencia generada por la primovacunación ocurrió mientras los animales mantenían diferente estatus de Cu, vale decir que el grupo control mantenía una carencia severa de Cu. Al momento de colocarse la segunda dosis de vacuna se debió realizar un destete que mejoró el estatus de Cu en el grupo Control, elevando la cupremia promedio al rango de normalidad (Tabla 3). Por lo expuesto, las fallas en la respuesta inmune a la vacuna fueron evidentes cuando el estatus era de deficiencia severa, pero desaparecieron cuando el estatus de Cu se normalizó.

Los títulos a IBR obtenidos en el presente experimento coinciden con los observados por Romera y col., (2000), y son apenas inferiores a los informados por otros autores (Kamaraj y col., 2009; Parreño y col., 2010). Esta diferencia podría deberse a que no se aguardó hasta los 60 días post-vacunación para evaluar los títulos, que es cuando se alcanza su máximo valor (Parreño y col., 2010). Por otro lado las diferentes vacunas generan también diferentes niveles de Ig específicas (Muylkens y col., 2007; Parreño y col., 2010). De cualquier modo, la asociación entre el estatus de Cu y la respuesta observada coincide con hallazgos previos. En este sentido existe evidencia que la carencia de Cu afecta la actividad de los macrófagos (Cerone y col., 2000) y reduce los niveles de Factor de Necrosis Tumoral (TNF), de interferón  $\gamma$  y de Interleucina 2 (IL-2) (Minatel y Carfagnini., 2000). Estas y otras citocinas poseen diferente importancia dependiendo del tipo de vacuna que se utilice (Zhang y col., 2011). Para el caso de vacunas muertas, como las aprobadas para su uso en Argentina, las citocinas también pueden variar con el tipo de adyuvante utilizado (Langellotti y col., 2007). En el presente experimento, el efecto de la suplementación fue evidente en la respuesta a la primera dosis vacunal. Considerando entonces que se vio alterada la respuesta primaria al virus, esto coincidiría con una menor expresión de CMH-II por parte de los macrófagos citada por Saker y col., (1998), así como la producción de IL-2 de la cual depende la respuesta con linfocitos TH1 (Minatel y Carfagnini., 2000; Abbas y col., 2008).

## VI – CONCLUSIONES

- ✓ En coincidencia con trabajos previos la deficiencia de Cu se agravó durante los períodos con excesos hídricos.
- ✓ En estados de deficiencias severas (cupremias < 30 µg/dl) los animales presentaron pérdidas de peso.
- ✓ La concentración de hemoglobina y el porcentaje de hematocrito se comportaron como indicadores tempranos de deficiencia de Cu.
- ✓ El VCM y HbCM disminuyeron lo que podría asociarse a anemias microcíticas e hipocromicas respectivamente.
- ✓ El hemograma leucocitario no evidenció alteraciones asociadas en los diferentes estatus de Cu.
- ✓ Los neutrófilos no evidenciaron alteraciones en sus capacidades de fagocitosis y lisis bacteriana, incluso durante deficiencias severas.
- ✓ El índice mitótico de linfocitos no se asoció a los niveles de deficiencia.
- ✓ En índice de daño en el ADN de los leucocitos circulantes resultó ser un sensible indicador de deficiencia, incluso cuando esta fue moderada (cupremias entre 30 y 60 µg/dl).
- ✓ La deficiencia severa de Cu indujo títulos vacunales bajos durante la primovacunación con IBR, siendo este efecto revertido al mejorar el estatus de Cu durante la revacunación.

## VII – BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Abbas AK, Lichtman HA, Pillai S. Inmunología celular y molecular 2008. 6ª Edición Elsevier España, Barcelona España. Arredondo y Nuñez, 2005.
2. Arthington JD, Corah LR, Blecha F, Hill DA. Effect of copper depletion and repletion on lymphocyte blastogenesis and neutrophil bactericidal function in beef heifers. J Anim Sci 1995;73(7):2079-85.
1. Arthington JD, Spell AR, Corah LR, Blecha F. Effect of molybdenum induced copper deficiency on in vivo and in vitro measures of neutrophil chemotaxis both before and following an inflammatory stressor. J Anim Sci. 1996;74(11):2759-64.
2. Attri S, Sharma N, Jahagirdar S, Thapa BR, Prasad R. Erythrocyte metabolism and antioxidant status of patients with Wilson disease with hemolytic anemia. Pediatr Res. 2006;59(4 Pt 1):593-7.
3. Balbuena, O.; McDowell, L. R.; Luciani, C. A.; Conrad, J. H.; Wilkinson, N. y Martin, F. G. Estudios de la nutrición mineral de los bovinos para carne del este de las provincias de Chaco y Formosa (Argentina). 3. Cobre, molibdeno y azufre. Vet. Arg. 1989-a;Vol VI, N° 56: 365-374.
4. Balbuena, O.; McDowell, L. R.; Mahyew, I. G.; Toledo, O. H.; Luciani, C. A.; Stahringer, R. C.; Wilkinson, N. y Conrad, J. H. Ataxia enzoótica tardía en corderos. Contribución al conocimiento de su etiología en el Chaco (Argentina). Vet. Arg. 1989-b;Vol VI, N° 52: 111-127.
5. Balemi SC, Grace ND, West DM, Smith SL, Knowles SO. Accumulation and depletion of liver copper stores in dairy cows challenged with a Cu-deficient diet and oral and injectable forms of Cu supplementation. N Z Vet J. 2010;58(3):137-41.
6. Barry AN, Shinde U, Lutsenko S. Structural organization of human Cu-transporting ATPases: learning from building blocks. J Biol Inorg Chem. 2010 Jan;15(1):47-59.

7. Bohman VR, Poole SC, Kvasnicka WG, Tronstad RJ, Collinson RW. The toxicology and composition of bovine tissues after parenteral administration of high levels of copper salts. *Vet Hum Toxicol.* 1987;29(4):307-12.
8. Boyne R, Arthur JR. Effects of molybdenum or iron induced copper deficiency on the viability and function of neutrophils from cattle. *Res Vet Sci.* 1986;41(3):417-9.
9. Buckley WT. A kinetic model of copper metabolism in lactating dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science.* 1991;71(1): 155-166,
10. Campbell AG, Coup MR, Bishop WH, Wright DE. Effect of elevated iron on the copper status of grazing cattle. *N Z J Agric Res.* 1974;17: 393-399.
11. Cater MA, and Mercer JFB. Copper in mammals: Mechanisms of homeostasis and pathophysiology. *Molecular Biology of Metal Homeostasis and Detoxification.* 2005;Pages. 14:101–29
12. Cerone SI, Sansinanea AS, Auza NJ. Copper deficiency alters the immune response of bovine. *Nutr Res.* 1995;15: 1333-41.
13. Cerone SI, Sansinanea AS, Streitenberger SA, Garcia MC, Auza NJ. Cytochrome The effect of copper deficiency on the peripheral blood cells of cattle. *Veterinary Research Communications.* 1998;22:47-57.
14. Cerone SI, Sansinanea AS, Streitenberger SA, Garcia MC, Auza NJ. Bovine monocyte-derived macrophage function in induced copper deficiency. *Gen Physiol Biophys.* 2000-a;19(1):49-58.
15. Cerone SI, Sansinanea AS, Streitenberger SA, Garcia MC, Auza NJ. Cytochrome c oxidase, Cu,Zn-superoxide dismutase, and ceruloplasmin activities in copper-deficient bovines. *Biol Trace Elem Res.* 2000-b;73(3):269
16. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993;49:481-93.
17. Collins JF, Prohaska JR, Knutson MD. Metabolic crossroads of iron and copper. *Nutr Rev.* 2010;68(3):133-47.



18. Correa LM y Lagos F. Efecto del molibdeno y del cobre en la producción de bovinos para carne en los bajos submeridionales .Rev.Arg.Prod.Anim. 1985;4(sup.3):99-101.
19. Cousin RJ. Absorption, transport, and hepatic metabolism of Cu and Zn: Specil reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol. Rev.* 1985;65:238.
20. Djordjević VB. Free radicals in cell biology. *Int Rev Cytol.* 2004;237:57-89.
21. El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidalo MA, Marie JC, Braut-Boucher F. p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. *Exp Mol Med.* 2009;41(4):217-25.
22. Fazzio LE. Caracterización de terneros con hipocuprosis. [Tesis doctoral]. Buenos Aires: Fac. Cs. Veterinarias, Univ. Nac. La Plata.; 2006
23. Fazzio LE, Rosa DE, Picco SJ, Melani G, Minatel L, Mattioli GA. Efecto de la suplementación parenteral con cobre durante el último tercio de gestación de vacas en zona de hipocuprosis. *Rev. Vet.* 2006;17(2):84-87.
24. Fazzio LE, Mattioli GA, Picco SJ, Rosa DE, Minatel L, Gimeno EJ. Diagnostic value of copper parameters to predict growth of suckling calves grazing native range in Argentina. *Pesq. Vet. Bras.* 2010;30(10):827-832.
25. Föllner M, Feil S, Ghoreschi K, Koka S, Gerling A, Thunemann M, et al Anemia and splenomegaly in cGKI-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(18):6771-6.
26. Gengelbach GP, Ward JD, Spears JW. Effect of dietary copper, iron, and molybdenum on growth and copper status of beef cows and calves. *J Anim Sci.* 1994;72(10):2722-7.
27. Gengelbach GP, Ward JD, Spears JW, Brown TT. Effects of copper deficiency and copper deficiency coupled with high dietary iron or molybdenum on phagocytic cell function and response of calves to a respiratory disease challenge. *Journal of Animal Science.* 1997;75(4):1112-18.

28. Gengelbach and Spears. Effects of Dietary Copper and Molybdenum on Copper Status, Cytokine Production, and Humoral Immune Response of Calves. *Journal of Dairy Science*. 1998;81 (12): 3286-92.
29. Gubler CJ, Cartwright GE, and Wintrobe MM. Enzyme activities and iron metabolism in copper and iron deficiencies. *J. Biol. Chem.* 1956;129: 533-46.
30. Haddad AS, Subbiah V, Lichtin AE, Theil KS, Maciejewski JP. Hypocupremia and bone marrow failure. *Haematologica*. 2008;93(1):1-5.
31. Han H, Archibeque SL, Engle TE. Characterization and identification of hepatic mRNA related to copper metabolism and homeostasis in cattle. *Biol Trace Elem Res*. 2009;129(1-3):130-6.
32. Hansen SL, Schlegel P, Legleiter LR, Lloyd KE, Spears JW. Bioavailability of copper from copper glycinate in steers fed high dietary sulfur and molybdenum. *J Anim Sci*. 2008;86(1):173-9.
33. Harris ED. Cellular copper transport and metabolism. *Annu Rev Nutr*. 2000;20:291-310.
34. Healy J, Tipton K. Ceruloplasmin and what it might do. *J Neural Transm*. 2007;114(6):777-81.
35. Hellman NE, Gitlin JD. Ceruloplasmin metabolism and function. *Annu Rev Nutr*. 2002;22:439-58.
36. Hilário MO, Amancio OM, dos Santos BR, Naspitz CK. Effects of nutritional copper deficiency on adult non-pregnant and pregnant rats and their newborns. *Arch Latinoam Nutr*. 1991;41(4):555-68.
37. Hill GM, Link JE. Transporters in the absorption and utilization of zinc and copper. *J Anim Sci*. 2009; 87(14):E85-E89
38. Humphries WR, Phillippo M, Young BW, Bremner I. The influence of dietary iron and molybdenum on copper metabolism in calves. *Br J Nutr*. 1983;49(1):77-86.

39. Igarza L, Agostini M, Becú Villalobos D, Auza, N. Effects of molibdenosis on luteinizing-hormone, folliclestimulating and estradiol hormones in rats. Arch Med Vet. 1996;28: 101-106.
40. Imataki O, Ohnishi H, Kitanaka A, Kubota Y, Ishida T, Tanaka T. Pancytopenia complicated with peripheral neuropathy due to copper deficiency: clinical diagnostic review. Intern Med. 2008;47(23):2063-5.
41. Imlay JA. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. Annu Rev Biochem. 2008;77:755-76.
42. Ingraham RH, Kappel LC, Morgan EB, Srikandakumar A. Correction of subnormal fertility with copper and magnesium supplementation. J Dairy Sci. 1987;70(1):167-80.
43. Jenkins KJ, Hidirolou M. Tolerance of the calf for excess copper in milk replacer. J Dairy Sci. 1989;72(1):150-6.
44. Kamaraj G, Rana S K and Srinivasan V A. Serological response in cattle immunized with inactivated oil and Algel adjuvant vaccines against infectious bovine rhinotracheitis. New Microbiol. 2009;32:135-141.
45. Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. Clinical Biochemistry of Domestic Animals, 6th Edition, British Library;1999.
46. Kappel LC, Ingraham RH, Morgan EB, Babcock DK. Plasma copper concentration and packed cell volume and their relationships to fertility and milk production in Holstein cows. Am J Vet Res. 1984;45(2):346-50.
47. Keen CL, Uriu-Hare JY, Hawk SN, Jankowski MA, Daston GP, Kwik-Urbe CL, Rucker RB. Effect of copper deficiency on prenatal development and pregnancy outcome. Am J Clin Nutr. 1998;67(5):1003S-1011S.
48. Kendall NR, Marsters P, Scaramuzzi RJ, Campbell BK. Expression of lysyl oxidase and effect of copper chloride and ammonium tetrathiomolybdate on bovine ovarian follicle granulosa cells cultured in serum-free media. Reproduction. 2003;125(5):657-65.

49. Kendall NR, Marsters P, Guo L, Scaramuzzi RJ, Campbell BK. Effect of copper and thiomolybdates on bovine theca cell differentiation in vitro. *J Endocrinol.* 2006;189(3):455-63.
50. Kincaid RL, White CL. The effects of ammonium tetrathiomolybdate intake on tissue copper and molybdenum in pregnant ewes and lambs. *J Anim Sci.* 1988;66(12):3252-8.
51. Kincaid RL, Gay CC, Krieger RI. Relationship of serum and plasma copper and ceruloplasmin concentrations of cattle and the effects of whole blood sample storage. *Am J Vet Res.* 1986;47(5):1157-9.
52. Kincaid, R.L. Assessment of trace mineral status of ruminants: A review. *Proceedings of the American Society of Animal Science*, 1999; 1-10.
53. Kodama H, Fujisawa C, Bhadhprasit W. Inherited Copper Transport Disorders: Biochemical Mechanisms, Diagnosis, and Treatment. *Current Drug Metabolism* 2012;13(3):237-250.
54. Lalioti V, Muruais G, Tsuchiya Y, Pulido D, Sandoval IV. Molecular mechanisms of copper homeostasis. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009;1(14):4878-903.
55. Langellotti C, Pappalardo JS, Mongini C, Quattrocchi V, Cebrian I, Taboga O, Zamorano P. Modulation of immune response induced by a genetic vaccine against Bovine Herpes Virus (BoHV-1) using different adjuvants. *Miami Winter Symposium Short Reports.* 2007;Volume 18. P 57.
56. Laven RA, Livesey CT. An evaluation of the effect of clotting and processing of blood samples on the recovery of copper from bovine blood. *Vet J.* 2006;171(2):295-300.
57. Lazarchick J. Update on anemia and neutropenia in copper deficiency. *Curr Opin Hematol.* 2012;19(1):58-60.
58. Liu N, Lo LS, Askary SH, Jones L, Kidane TZ, Trang T, Nguyen M, Goforth J, Chu YH, Vivas E, Tsai M, Westbrook T, Linder MC. Transcuprein is a macroglobulin regulated by copper and iron availability. *J Nutr Biochem.* 2007;18(9):597-608.

59. Lönnerdal B. Intestinal regulation of copper homeostasis: a developmental perspective. *Am J Clin Nutr.* 2008;88(3):846S-50S.
60. Løvstad RA. A kinetic study on the distribution of Cu(II)-ions between albumin and transferrin. *Biometals.* 2004;17(2):111-3.
61. Lutsenko S, Barnes NL, Bartee MY, Dmitriev OY. Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiol Rev.* 2007;87(3):1011-46.
62. Lutsenko S, LeShane ES, Shinde U. Biochemical basis of regulation of human copper-transporting ATPases. *Arch Biochem Biophys.* 2007;463(2):134-48.
63. Maas J. Relationship between nutrition and reproduction in beef cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1987;3(3):633-46.
64. Mattioli GA. Caracterización de la hipocuprosis bovina en el Partido de Magdalena (Provincia de Buenos Aires) [tesis doctoral] Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. 1998
65. Mattioli, G.A.; Fazzio, L.E.; Picco, S.J.; Rosa, D.E.; Melani, G.; Palacios, A.: Therapeutic effects of strategic supplementation with copper in breeding calves. *Rev. vet.* 2007;18:19–13
66. Mattioli GA. Nutrición Mineral y Vitamínica de Bovinos. Editor responsable: Mattioli, GA. Autores: Fazzio, L.E.; Mattioli, G.A.; Picco, S.J.; Relling, A. y Rosa, D.E. Editorial CCB Academic press. 264 páginas. Primera edición año 2013. La Plata, Argentina. 2013.
67. McDowell, LR. Mineral in Animal and Human Nutrition. Academic Press, NY, USA. 1992
68. Medeiros DM, Jennings D. Role of copper in mitochondrial biogenesis via interaction with ATP synthase and cytochrome c oxidase. *J Bioenerg Biomembr.* 2002;34(5):389-95.
69. Meyer LA, Durley AP, Prohaska JR, Harris ZL. Copper transport and metabolism are normal in aceruloplasminemic mice. *J Biol Chem.* 2001;276(39):36857-61.

70. Mills CF, Dalgarno AC, Wenham G. Biochemical and pathological changes in tissues of Friesian cattle during the experimental induction of copper deficiency. *Br J Nutr.* 1976;35(3):309-31.
71. Mills, CF. The physiological and pathological basis of trace element deficiency disease. En *Trace elements in animals productions and veterinary practice*. Edit: Suttle NF, Gunn RG, Allen WM, Linklater KA and Wiener G. 1983;1(1): 1-10.
72. Mills CF. Biochemical and physiological indicators of mineral status in animals: copper, cobalt and zinc. *J. Anim. Sci.* 1987;65:1702-11
73. Minatel L. and Carfagnini J.C. Copper deficiency and immune response in ruminants. *Nutrition Research.* 2000;20(10)1519-29.
74. Minervino AH, Barrêto Júnior RA, Queiroz GF, Headley SA, Ortolani EL. Predictive values of aspartate aminotransferase and gamma-glutamyl transferase for the hepatic accumulation of copper in cattle and buffalo. *J Vet Diagn Invest.* 2008;20(6):791-5.
75. Miranda M, Gutiérrez B, Benedito JL, Blanco-Penedo I, García-Vaquero M, López-Alonso M. Influence of breed on blood and tissue copper status in growing and finishing steers fed diets supplemented with copper. *Arch Anim Nutr.* 2010;64(2):98-110.
76. Mullis LA, Spears JW, McCraw BL. Effects of breed (Angus vs Simmental) and copper and zinc source on mineral status of steers fed high dietary iron. *J Anim Sci.* 2003;81(1):318-22.
77. Muylkens B, Thiry J, Kirten P, Schynts F, Thiry E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Vet Res.* 2007;38(2):181-209.
78. Nose Y, Wood LK, Kim BE, Prohaska JR, Fry RS, Spears JW, Thiele DJ. Ctr1 is an apical copper transporter in mammalian intestinal epithelial cells in vivo that is controlled at the level of protein stability. *J Biol Chem.* 2010;285(42):32385-92.

79. Nozik-Grayck E, Suliman HB, Piantadosi CA. Extracellular superoxide dismutase. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(12):2466-71.
80. National Research Council. Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Seventh Revised Edition, 2001. Washington, DC: The National Academies Press, 2001.
81. Oldham KM, Bowen PE. Oxidative stress in critical care: Is antioxidant supplementation beneficial. *Journal of the American Dietetic Association.* 1998;98:1001-8.
82. Pal DT, Gowda NK, Prasad CS, Amarnath R, Bharadwaj U, Suresh Babu G, Sampath KT. Effect of copper- and zinc-methionine supplementation on bioavailability, mineral status and tissue concentrations of copper and zinc in ewes. *J Trace Elem Med Biol.* 2010;24(2):89-94.
83. Parreño V, López MV, Rodríguez D, Vena MM, Izuel M, Filippi J, Romera A, Faverin C, Bellinzoni R, Fernandez F, Marangunic L. Development and statistical validation of a guinea pig model for vaccine potency testing against Infectious Bovine Rhinotracheitis (IBR) virus. *Vaccine.* 2010;28(13):2539-49.
84. Phillippo M, Humphriesa WR, Atkinsona T, Hendersona GD and Garthwaitea PH. The effect of dietary molybdenum and iron on copper status, puberty, fertility and oestrous cycles in cattle. *J. Agric. Sci. Camb.* 1987;109:321-336.
85. Picco SJ, De Luca JC, Mattioli GA, Dulout FN. DNA damage induced by copper deficiency in cattle assessed by the comet assay. *Mutation Research.* 2001;498:1-6.
86. Picco SJ, Abba MC, Mattioli GA, Fazzio LE, Rosa D, De Luca JC, Dulout FN. Association between copper deficiency and DNA damage in cattle. *Mutagenesis.* 2004-a;19(6):453-6.
87. Picco SJ, Mattioli GA, Fazzio LE, Rosa DE y Dulout FN. Effect of 3-aminobenzamide on lymphocytes of copper-deficient cattle. *Journal of Basic and Applied Genetics.* 2004-b;16(1/2):13-17.

88. Prohaska JR. Role of copper transporters in copper homeostasis. *Am J Clin Nutr.* 2008;88(3):826S-9S.
89. Ramirez CE, Tittarelli CM, Mattioli GA, Giuliadori MJ, Puchuri MC. Hipocupremia bovina en 5 partidos de la provincia de Buenos Aires Argentina. *Vet Arg.* 1997;14(131):12-7.
90. Ramírez, C.E., Mattioli, G.A., Tittarelli, C.M., Giuliadori, M.J. and Yano, H. Cattle Hypocuprosis in Argentina Associated with Periodically Flooded Soils. *Livestock Production Science.* 1998;55: 47-52.
91. Ricciardino, M. Z.; Medus, P. D. y Tantin, H. Deficiencia de cobre y selenio en vaquillonas sobre pastura natural. 2. Efectos sobre ganancia de peso y parámetros bioquímicos. INTA EEA C. del Uruguay. *Prod. Anim.* 1991-b;3: 222-229.
92. Ricciardino, M. Z.; Medus, P. D.; Gomez, M y Rucksan, B. E. Deficiencia de cobre y selenio en vaquillonas sobre pastura natural. 1. Causas y efectos inherentes a la pastura. INTA EEA C. del Uruguay. *Prod. Anim.* 1991-a;3: 213-221.
93. Ringler DJ. Inflammation and repair. In: Jones TC, Hunt RD, King NW. *Veterinary pathology.* 6th edition, Baltimore, USA. Williams & Wilkins, Pp: 113-57. 1996.
94. Roberts EA, Sarkar B. Liver as a key organ in the supply, storage, and excretion of copper. *Am J Clin Nutr.* 2008;88(3):851S-4S.
95. Romera SA, Hilgers LA, Puntel M, Zamorano PI, Alcon VL, Dus Santos MJ, Blanco Viera J, Borca MV, Sadir AM. Adjuvant effects of sulfolipo-cyclodextrin in a squalane-in-water and water-in-mineral oil emulsions for BHV-1 vaccines in cattle. *Vaccine.* 2000;19(1):132-41.
96. Rosa DE, Fazzio LE, Picco SJ, Minatel, L, Mattioli GA. Caracterización de terneros con menores ganancias diarias de peso por hipocuprosis. *Veterinaria Cuyana,* 2006;1(2):41-45.



97. Saker KE, Allen VG, Kalnitsky J, Thatcher CD, Swecker WS, Jr and Fontenot JP. Monocyte immune cell response and copper status in beef steers that grazed endophyte-infected tall fescue. *J Anim Sci*; 1998;76:2694-00.
98. Singh NP, McCoy MT, Tice RR and Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 1988;175:184-191.
99. Soltan MH, Jenkins DM. Plasma copper and zinc concentrations and infertility. *Br J Obstet Gynaecol.* 1983;90(5):457-9.
100. Spears J.W. Micronutrients and immune function in cattle. *Proceedings of the Nutrition Society.* 2000;59:587-94.
101. Spears JW. Trace mineral bioavailability in ruminants. *J Nutr.* 2003;133(5 Suppl 1):1506S-9S.
102. Stabel JR, Spears JW, Brown Jr TT. Effect of copper deficiency on tissue, blood characteristics, and immune function of calves challenged with infectious bovine rhinotracheitis virus and *Pasteurella hemolytica*. *J Anim Sci.* 1993;71:1247-55.
103. Sukalski KA, LaBerge TP, Johnson WT. In vivo oxidative modification of erythrocyte membrane proteins in copper deficiency. *Free Radic Biol Med.* 1997;22(5):835-42.
104. Suttle, N. F. (1983). The nutritional basis for trace element deficiencies in ruminant livestock. In *Trace elements in animals productions and veterinary practice*. Occ. publication N° 7 - British Society of Animal Production. Edit: Suttle, N. F., Gunn, R. G., Allen, W. M., Linklater, K. A. and Wiener G. 2.1: 19-25.
105. Suttle NF. Problems in the diagnosis and anticipation of trace element deficiencies in grazing livestock. *Vet. Rec.* 1986-a;119:148-52.
106. Suttle NF. Copper deficiency in ruminant; recent developments. *Vet. Rec.* 1986-b;119: 519-22.
107. Suttle NF, Jones, DG, Woolliams JA and Woolliams C. Copper supplementation during pregnancy can reduce perinatal mortality and improve early growth in lambs. *Proceedings of the Nutrition Society* 1987b;46, 68A.

108. Suttle NF. Mineral nutrition of livestock / Neville F. 4th ed. 2010
109. Tapiero H, Townsend DM and Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology, Copper Biomed. Pharmacother. 2003;57:386–98.
110. Torre PM, Harmon RJ, Sordillo LM, Boissonneault GA, Hemken RW, Trammell DS, Clark TW. Modulation of bovine mononuclear cell proliferation and cytokine production by dietary copper insufficiency. J Nutr Immunol. 1995;3:3-20.
111. Turnlund JR, Keyes WR, Kim SK, Domek JM. Long-term high copper intake: effects on copper absorption, retention, and homeostasis in men. Am J Clin Nutr. 2005;81(4):822-8.
112. Turski ML, Thiele DJ. New roles for copper metabolism in cell proliferation, signaling, and disease. J Biol Chem. 2009;284(2):717-21.
113. Underwood EJ. The Mineral Nutrition of Livestock, 2nd ed Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, UK, p. 1. 1981
114. Underwood EJ, Suttle NF. (1999). The Mineral Nutrition of Livestock. CABI Publishing. London. UK.
115. van den Berghe PV, Klomp LW. Posttranslational regulation of copper transporters. J Biol Inorg Chem. 2010;15(1): 37-46.
116. Victor VM, Rocha M, De la Fuente M. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. Int Immunopharmacol. 2004;4(3):327-47.
117. Ward JD, Spears JW, Kegley EB. Effect of copper level and source (copper lysine vs copper sulfate) on copper status, performance, and immune response in growing steers fed diets with or without supplemental molybdenum and sulfur. J Anim Sci. 1993;71:2748-55.
118. Ward JD, Gengelbach GP and Spears JW. The effects of copper deficiency with or without high dietary iron or molybdenum on immune function of cattle. J Anim Sci. 1997;75:1400-08.

119. Ward and Spears. The effects of low-copper diets with or without supplemental molybdenum on specific immune responses of stressed cattle. *J Anim Sci.* 1999;77:230-37.
120. Weiss KH, Lozoya JC, Tuma S, Gotthardt D, Reichert J, Eehalt R, Stremmel W, Füllekrug J. Copper-induced translocation of the Wilson disease protein ATP7B independent of Murr1/COMMD1 and Rab7. *Am J Pathol.* 2008;173(6):1783-94.
121. White C, Lee J, Kambe T, Fritsche K, Petris MJ. A role for the ATP7A copper-transporting ATPase in macrophage bactericidal activity. *J Biol Chem.* 2009;284(49):33949-56.
122. Xin Z, Waterman DF, Hemken RW, Harmon RJ. Effects of copper status on neutrophil function, Superoxide Dismutase, and copper distribution in steers. *J Dairy Sci.* 1991;74: 3078-85.
123. Zhang M, Fu S, Deng M, Xie Q, Xu H, Liu Z, Hu C, Chen H, Guo A. Attenuation of bovine herpes virus type 1 by deletion of its glycoprotein G and tk genes and protection against virulent viral challenge. *Vaccine.* 2011;29(48):8943-50.

## VIII-Tablas y figuras

Tabla 1: Metaloenzimas Cu-dependientes y su rol fisiológico\*\*.

Cuproenzimas	Función
Aminooxidasas (monoamino oxidasa, tiramino oxidasa e histamino oxidasa)	Desaminación de aminas primarias.
Ceruloplasmina	Oxidación del hierro, transporte del cobre, antioxidante.
Cobre–zinc superóxido dismutasa (Cu-Zn SOD)	Detoxificación de radicales libres.
Citocromo C oxidasa	Transporte de electrones.
Diamino oxidasa	Desaminación oxidativa de aminas.
Dopamina $\beta$ -hidroxilasa	Producción de catecolaminas.
SOD Extracelular	Detoxificación de radicales libres.
Ferroxidasa II	Oxidación del hierro.
Hefaestina	hierrooxidasa, exportación del hierro desde intestino.
Lisil oxidasa	Formación de puentes cruzados de colágeno y elastina.
Peptidilglicine $\alpha$ -amida monooxigenasa	$\alpha$ -amidación de péptidos.
Thiol oxidasa	Formación de puentes disulfuro.
Tirosinasa	Producción de melanina.

\*\*Tomado de Bonham y col.,, 2002

**Tabla 2.** Clasificación de las cupremias en rangos y su asociación con el estatus del animal y sus posibles consecuencias.

<b>Rangos de Cupremia</b>	<b>Estatus de Cu en el animal</b>	<b>Consecuencias</b>
<b>Normocupremia</b> ( $> 60 \mu\text{g/dl}$ )	Reserva hepática normal, con capacidad para cubrir etapas de carencia	<b>Nulas.</b> El animal cubre sus requerimientos de Cu y todas las actividades dependientes del mismo son cubiertas sin problemas.
<b>Hipocupremia moderada</b> ( $30 - 60 \mu\text{g/dl}$ )	Reserva hepática recientemente agotada, y no puede sostener la cupremia	<b>Poco probables.</b> El bajo aporte de Cu a los tejidos recién se inicia y se sostienen las principales funciones Cu-dependientes
<b>Hipocupremia severa</b> ( $< 30 \mu\text{g/dl}$ )	Reserva hepática totalmente agotada con fallas progresivas de cuproenzimas	<b>Muy probables.</b> La fallas de las cuproenzimas llevan a consecuencias inaparentes y luego clínicas de la enfermedad

**Tabla 3.** Valores medios de cupremias ( $\mu\text{g/dL}$ ), error estándar de la media (EEM) y efecto del tratamiento (trt), muestreo (mt) e interacción (trt\*mt) en el Experimento 1 y 2.

Experimento	Tratamiento	Muestreo				EEM	Valor P		
		1	2	3	4		trt	mt	Trt*mt
1	Cobre	52 <sup>y</sup>	78 <sup>a</sup>	80 <sup>a</sup>	81 <sup>a</sup>	3,61	0,01	0,01	0,01
	Control	61 <sup>z</sup>	64 <sup>b</sup>	57 <sup>b</sup>	28 <sup>b</sup>				
2	Cobre	14	64 <sup>a</sup>	67 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	3,41	0,01	0,01	0,01
	Control	15	20 <sup>b</sup>	22 <sup>b</sup>	66 <sup>b</sup>				

a-b: Separación de medias para cada muestreo en particular, usando la herramienta slice de SAS, superíndices distintos en la columna, valor de  $P < 0,05$ .

y-z: Separación de medias para cada muestreo en particular, usando la herramienta slice de SAS, superíndices distintos en la columna, valor de  $P < 0,10$ .

**Tabla 4.** Valores medios de peso (en Kg), error estándar de la media (EEM) y efecto del tratamiento (trt), muestreo (mt) e interacción (trt\*mt) en los Experimentos 1 y 2.

Experimento	Tratamiento	Muestreo				EEM	Valor P		
		1	2	3	4		trt	mt	Trt*mt
1	Cobre	91	124	159	185	4,84	0,84	0,01	0,99
	Control	90	126	159	186				
2	Cobre	104	136 <sup>y</sup>	165 <sup>a</sup>	182 <sup>a</sup>	4,73	0,05	0,01	0,01
	Control	97	124 <sup>z</sup>	150 <sup>b</sup>	164 <sup>b</sup>				

a-b: Separación de medias para cada muestreo en particular, usando la herramienta slice de SAS, superíndices distintos en la columna, valor de  $P < 0,05$ .

y-z: Separación de medias para cada muestreo en particular, usando la herramienta slice de SAS, superíndices distintos en la columna, valor de  $P < 0,10$ .

**Tabla 5.** Valores medios de recuento de eritrocitos (en millones/mL), error estándar de la media (EEM) y efecto del tratamiento (trt), muestreo (mt) e interacción (trt\*mt) en el Experimento 1 y 2.

Experimento	Tratamiento	Muestreo				EEM	Valor P		
		1	2	3	4		trt	mt	Trt*mt
1	Cobre	9,698	9,663	8,669	9,138	0,214	0,99	0,01	0,14
	Control	9,890	9,777	8,702	8,793				
2	Cobre	9.351	10.054	9.089	9.547	0.320	0.44	0.01	0.33
	Control	9.697	9.492	8.508	9.673				



**Tabla 6.** Valores medios de hematocrito (%), error estándar de la media (EMM) y efecto del tratamiento (trt), muestreo (mt) e interacción (trt\*mt) en el Experimento 1 y 2.

Experimento	Tratamiento	Muestreo				EEM	Valor P		
		1	2	3	4		trt	mt	Trt*mt
1	Cobre	38,5	37,5	36,5	37,9	0,58	0,72	0,01	0,11
	Control	39,5	37,5	36	36,2				
2	Cobre	36.7	39.2 <sup>a</sup>	38.2 <sup>a</sup>	40.3 <sup>y</sup>	0.35	0.01	0.01	0.38
	Control	35.9	36.1 <sup>b</sup>	33.8 <sup>b</sup>	37.9 <sup>z</sup>				

a-b: Separación de medias para cada muestreo en particular, usando la herramienta slice de SAS, superíndices distintos en la columna, valor de P < 0,05.

y-z: Separación de medias para cada muestreo en particular, usando la herramienta slice de SAS, superíndices distintos en la columna, valor de P < 0,10.

**Tabla 7.** Valores medios de concentración de Hemoglobina (en mg/dL), error estándar de la media (EMM) y efecto del tratamiento (trt), muestreo (mt) e interacción (trt\*mt) en el Experimento 1 y 2.

Experimento	Tratamiento	Muestreo				EEM	Valor P		
		1	2	3	4		trt	mt	Trt*mt
1	Cobre	12,2	12,2	11,6	13,0 <sup>y</sup>	0,24	0,42	0,01	0,16
	Control	12,4	12,1	11,2	12,4 <sup>z</sup>				
2	Cobre	11.3	13.0 <sup>a</sup>	12.4 <sup>a</sup>	13.2	0.35	0.01	0.01	0.38
	Control	11.3	11.9 <sup>b</sup>	11.3 <sup>b</sup>	12.5				

a-b: Separación de medias para cada muestreo en particular, usando la herramienta slice de SAS, superíndices distintos en la columna, valor de  $P < 0,05$ .

y-z: Separación de medias para cada muestreo en particular, usando la herramienta slice de SAS, superíndices distintos en la columna, valor de  $P < 0,10$ .

**Tabla 8.** Valores medios de volumen corpuscular medio (VCM) (expresado en fL), concentración de Hemoglobina corpuscular media (CHbCM) (expresado en g/dL) y hemoglobina corpuscular media (HbCM) (expresado en pg), error estándar de la media (EEM) y efecto del tratamiento (trt), muestreo (mt) e interacción (trt\*mt) en el Experimento 1 y 2.

Experimento	parámetro	trt	Muestreo				EEM	Valor P		
			1	2	3	4		trt	mt	trt*mt
1	VCM	Cobre	40	39	42	41	0,88	0,78	0,01	0,73
		Control	40	38	42	41				
2		Cobre	40	39	42	42 <sup>a</sup>	1.10	0.01	0.02	0.74
		Control	37	38	40	39 <sup>b</sup>				
1	CHbCM	Cobre	32	33	32 <sup>a</sup>	34	0,2	0,13	0,01	0,55
		Control	31	32	31 <sup>b</sup>	34				
2		Cobre	31	33	32.5 <sup>y</sup>	33	0.32	0.09	0,01	0.52
		Control	31	33	33.4 <sup>z</sup>	33				
1	HbCM	Cobre	13	13	13	14	0,3	0,56	0,01	0,22
		Control	13	12	13	14				
2		Cobre	12	13	14	14 <sup>a</sup>	0.30	0.01	0,01	0.80
		Control	12	13	13	13 <sup>b</sup>				

a-b: Separación de medias para cada muestreo en particular, usando la herramienta slice de SAS, superíndices distintos en la columna, valor de P < 0,05.

y-z: Separación de medias para cada muestreo en particular, usando la herramienta slice de SAS, superíndices distintos en la columna, valor de P < 0,10.

**Tabla 9.** Valores medios del recuento de leucocitos, neutrófilos y linfocitos (por mm<sup>3</sup>) error estándar de la media (EMM) y efecto del tratamiento (trt), muestreo (mt) e interacción (trt\*mt) en el Experimento 1 y 2.

Experi mento	Parámetro	trt	Muestreo				EEM	Valor P		
			1	2	3	4		trt	mt	Trt*mt
1	Leucocitos	Cobre	7890	7200	8640	8290	474	0,64	0,10	0,18
		Control	7610	7710	7700	7980				
2		Cobre	6733	6960	7420	8270	864	0.40	0.70	0.70
		Control	8033	7289	8478	7650				
1	Linfocitos	Cobre	6100 <sup>y</sup>	5090	4858	4611	322	0,82	0,01	0,19
		Control	5413 <sup>z</sup>	5486	5227	4803				
2		Cobre	4255	4936	5271	5553	652	0.50	0.40	0.5181
		Control	5070	5078	6283	4847				
1	Neutrófilos	Cobre	1756	2078	3705 <sup>a</sup>	3601	318	0,27	0,01	0,02
		Control	2180	2209	2459 <sup>b</sup>	3007				
2		Cobre	2155	1727	1604	2301	347	0.50	0.04	0.91
		Control	2609	1737	1631	2462				

a-b: Separación de medias para cada muestreo en particular, usando la herramienta slice de SAS, superíndices distintos en la columna, valor de P < 0,05.

y-z: Separación de medias para cada muestreo en particular, usando la herramienta slice de SAS, superíndices distintos en la columna, valor de P < 0,10.

**Tabla 10.** Valores promedios de la capacidad lítica y fagocítica (%), error estándar de la media (EEM) y efecto del tratamiento (trt), muestreo (mt) e interacción (trt\*mt) en el Experimento 1 y 2.

Experimento	Parámetro	trt	Muestreo				EEM	Valor P		
			1	2	3	4		trt	mt	Trt*mt
1	Capacidad lítica	Cobre	89	81	96	84	4,56	0,74	0,05	0,93
		Control	88	83	95	88				
2	Capacidad lítica	Cobre	64	78	95	58	8,19	0,25	0,01	0,96
		Control	70	87	97	68				
1	Capacidad fagocítica	Cobre	85	73	76	68	5,20	0,98	0,01	0,02
		Control	83	79	89	55				
2	Capacidad fagocítica	Cobre	81	74	89	68	6,30	0,58	0,02	0,56
		Control	85	73	79	67				

**Tabla 11.** Valores promedios del índice de daño en el ADN (%), índice mitótico (%) error estándar de la media (EEM) y efecto del tratamiento (trt), muestreo (mt) e interacción (trt\*mt) en el Experimento 1 y 2.

Experimento	Parámetro	trt	Muestreo				EEM	Valor P		
			1	2	3	4		trt	mt	Trt*mt
1	Índice de daño del ADN	Cobre	5,88	7,79	7,59	1,29 <sup>a</sup>	0,74	0,01	0,01	0,01
		Control	7,77	7,30	9,20	6,60 <sup>b</sup>				
2		Cobre	1,80	1,90	2,00 <sup>a</sup>	2,30 <sup>a</sup>	0,87	0,01	0,01	0,01
		Control	1,10	2,80	5,70 <sup>b</sup>	8,70 <sup>b</sup>				
1	Índice mitótico	Cobre	32,4 <sup>a</sup>	31,3	34,8 <sup>a</sup>	40,5 <sup>a</sup>	1,28	0,05	0,01	0,01
		Control	38,5 <sup>b</sup>	32,0	38,4 <sup>b</sup>	37,2 <sup>b</sup>				
2		Cobre	39,2 <sup>a</sup>	38,9 <sup>a</sup>	37,6 <sup>a</sup>	37,1 <sup>a</sup>	1,04	0,01	0,22	0,50
		Control	31,0 <sup>b</sup>	32,9 <sup>b</sup>	30,0 <sup>b</sup>	31,7 <sup>b</sup>				

a-b: Separación de medias para cada muestreo en particular, usando la herramienta slice de SAS, superíndices distintos valor de  $P < 0,05$ .

y-z: Separación de medias para cada muestreo en particular, usando la herramienta slice de SAS, superíndices distintos valor de  $P < 0,10$ .

**Tabla 12.** Valores medios de la conversión logarítmica de los títulos de IBR, error estándar de la media (EEM) y efecto del tratamiento (trt), muestreo (mt) e interacción (trt\*mt) en el Experimento 2.

Experimento	Tratamiento	Muestreo			EEM	Valor P		
		0	+20	+40		trt	mt	Trt*mt
2	Cobre	0,30	1,05 <sup>a</sup>	1,23	0,11	0,05	<0,01	0,07
	Control	0,30	0,57 <sup>b</sup>	1,14				

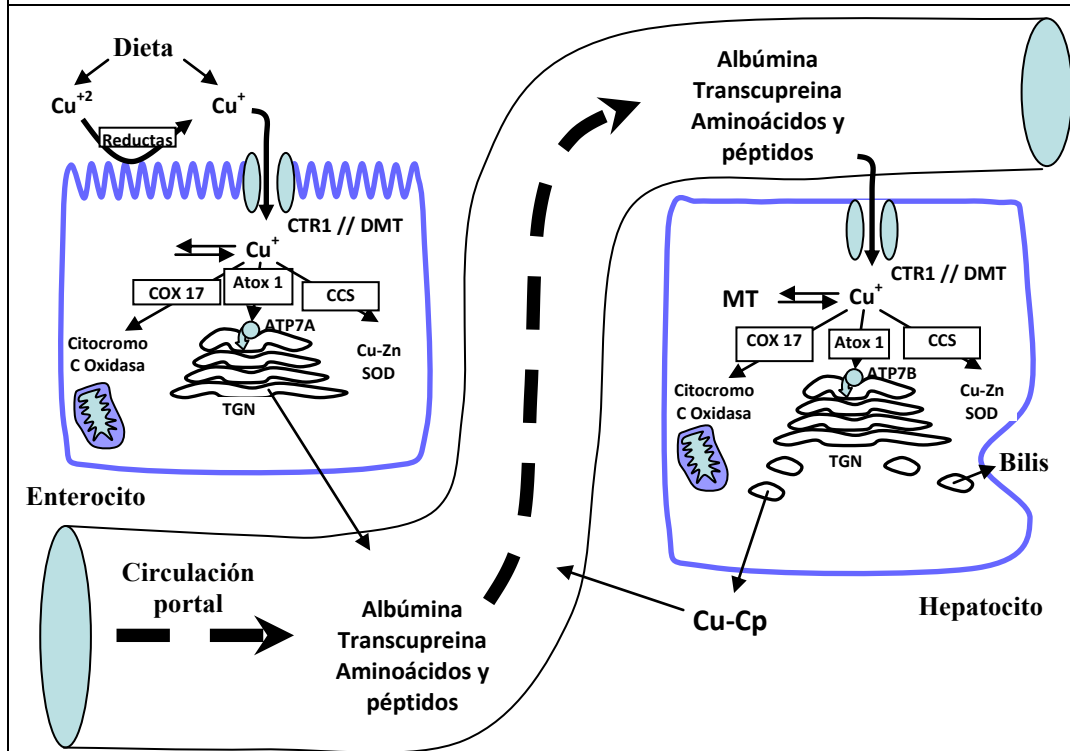
a-b: Separación de medias para cada muestreo en particular, usando la herramienta slice de SAS, superíndices distintos valor de  $P < 0,05$ .

**Tabla 13.** Distribuciones de animales en porcentaje por tratamiento, día y título.  
Diferenciando entre positivos (+) y negativos (-) a IBR

día	0						20						40					
Titulo	(-)	(+) 8 16 32 64 128					(-)	(+) 8 16 32 64 128					(-)	(+) 8 16 32 64 128				
cobre	100	0	0	0	0	0	30	0	40	20	10	0	0	20	50	30	0	0
control	100	0	0	0	0	0	70	20	0	0	10	0	0	50	30	10	10	0

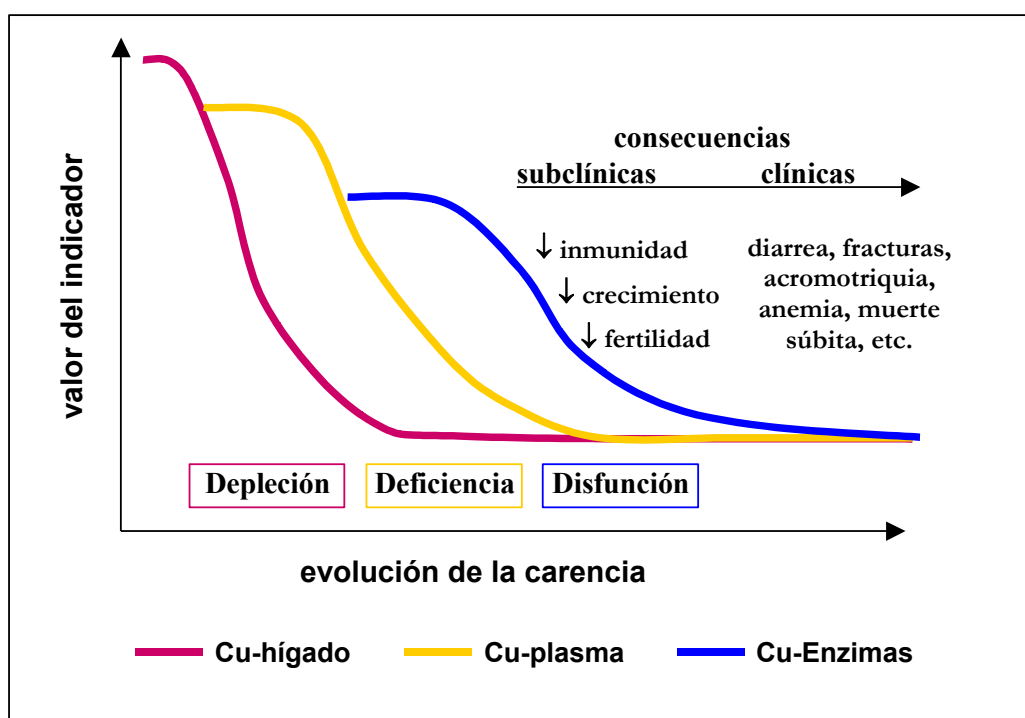


**Figura 1:** Metabolismo celular del cobre en el enterocito y en el hepatocito



MT: metalotioneína; TGN: Trans-Golgi Network; COX17, Atox 1 y CCS: Chaperonas del Cu; CP: ceruloplasmina; CTR1 y DMT: transportadores de membrana; ATP7A y ATP7B: ATPasas de transporte activo de Cu al TGN. (Adaptado de Collins y col 2010)

**Figura 2.** Etapas sucesivas de la deficiencia de Cu en el animal. Modificada de Underwood y Suttle., (1999).



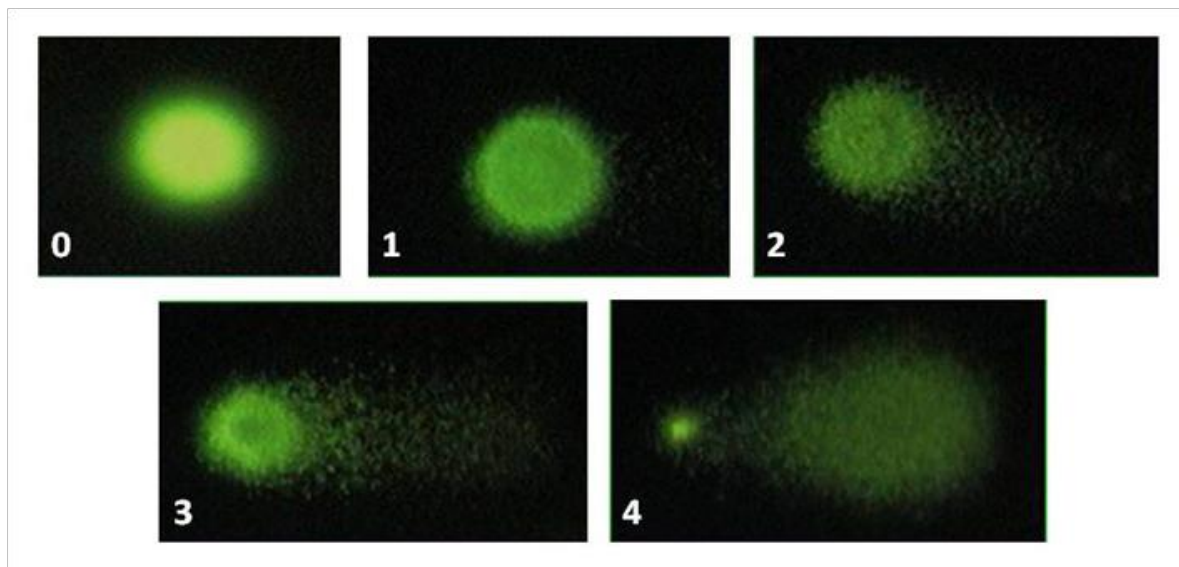
**Figura 3.** Acromotriquia generalizada de un ternero cruza Aberdeen Angus-Hereford con hipocuprosis



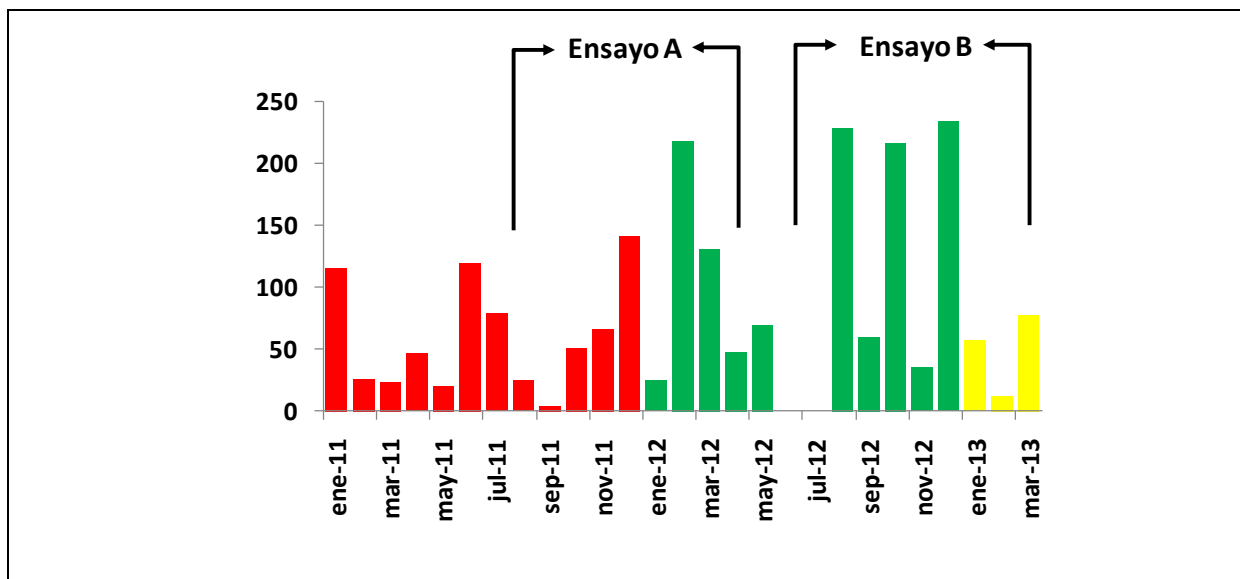
**Figura 4.** Anteojera en un ternero Aberdeen Angus con hipocuprosis



**Figura 4.** Clasificación de las células según la longitud del cometa. Grado 0 (cola no visible), Grado 1 (cometas con cola delgada), Grado 2 (cometas con cola difusa), Grado 3 (cometas con colas bien definidas), Grado 4 (cometas con una clara disminución en el diámetro de la cabeza y con una cola bien definida) (Collins, 2004)



**Figura 5:** Precipitaciones (mm de agua) durante el período de experimentos.



## IX-Abreviaturas

Atox1: antioxidant 1 copper chaperone

ATP7A: copper-transporting P-type ATPase A

ATP7B: copper-transporting P-type ATPase B

BoHV-1: herpes virus bovino tipo 1

CCO: Citocromo C Oxidasa

CCS: copper chaperone for superoxide dismutase

CHbCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media

Cox17: cytochrome c oxidase copper chaperone

Cp: ceruloplasmina

CTR1: Copper transporter 1

Cu: cobre

Cu-Zn SOD: Cobre–zinc superóxido dismutasa

Dcytb: Duodenal cytochrome b

DMT1: transportador de cationes bivalentes 1

ERO: especies reactivas de oxígeno

GDP: ganancia diaria de peso

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrógeno

Hb: hemoglobina

HbCM: Hemoglobina corpuscular media

Hto: hematocrito

IBR: Rinotraqueitis infecciosa bovina

ID: El Índice de Daño del ADN

MT: metalotioneína

NK: natural killer

O<sub>2</sub><sup>•</sup>: iones superóxido

OH<sup>•</sup>: radical hidroxilo

ON: óxido nítrico

PHA: fitohemoaglutinina

PWM: pokeweed mitogen

Steap 2: six transmembrane epithelial antigen of the prostate 2

TGN: trans Golgi network

TNF: factor de necrosis tumoral

VCM: volumen corpuscular medio